

Das GAF-Domänen-Protein NreA - ein neuartiger Nitratrezeptor aus *Staphylococcus carnosus*

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES

„DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Mareike Koch-Singenstreu
geb. am 15.07.1985 in Mainz

Mainz, Oktober 2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung/Abstract	1
2. Einleitung	3
3. Material und Methoden	11
3.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	11
3.2 Verwendete Medien zur Anzucht der Bakterien	22
3.3 Kultivierung der Bakterien	26
3.4 Biochemische Methoden	27
3.5 Genetische Methoden	42
3.6 Bioinformatische Methoden	49
4. Ergebnisse	50
4.1 Wachstumsverhalten	51
4.2 Gegenüberstellung von NreA und homologen Proteinen	53
4.3 Auswahl der NreA-Mutanten	56
4.4 NreA-Kristallstruktur mit Iodid oder Nitrat	57
4.5 Bedeutung von NreABC für die anaerobe Nitratatmung: <i>narG-lip</i> -Reportergergenstudien	59
4.6 Komplementierungen zu wildtypischem NreABC-Phänotyp	61
4.7 Einfluss von Mutationen in NreA auf die <i>narG-lip</i> Expression in Reportergergenstudien: drei Klassen von NreA-Varianten	62
4.7.1 NreA-Mutanten mit wildtypischem Phänotyp	64
4.7.2 NreA-Mutante mit abgeschwächt wildtypischen Phänotyp	65
4.7.3 NreA-Mutanten mit Δ NreABC/OFF-Phänotyp	65
4.7.4 NreA-Mutanten mit Δ NreA/ON-Phänotyp	66
4.7.5 NreA-Mutante mit abgeschwächtem Δ NreA/ON-Phänotyp	67
4.7.6 Mutanten mit abweichendem Phänotypen	68
4.8 Korrelation zwischen Lage der mutierten Aminosäurereste im NreA-Kristall und ihrer <i>narG-lip</i> Expression	69
4.8.1 An der Nitratbindung beteiligte Reste in der Nitratbindetasche	69
4.8.2 In der Peripherie liegende Reste	71
4.9 Proteinstabilität der mutierten Varianten von NreA <i>in vivo</i>	76
4.10 Iodidabhängigkeit der NreA-Funktion <i>in vivo</i> : <i>narG-lip</i> -Expressionen mit Iodid	77
4.11 Protein-Protein-Interaktionen innerhalb von NreABC	78
4.11.1 Beeinflussung der Regulation der Zielgene von NreBC durch NreA und Nitrat	78

4.11.2 Anaerobe Interaktionsmessungen von NreABC	79
4.11.3 Homologe Interaktionen von NreA, NreB und NreC unter Anaerobiose: Effekt von Nitrat	80
4.11.4 Heterologe Interaktionen von NreA, NreB und NreC unter Anaerobiose: Effekt von Nitrat	82
4.12 Größenbestimmung durch Gelfiltration	84
4.13 <i>In vitro</i> Cross-Linking Experimente mit NreA und NreB	85
4.14 <i>In vivo</i> Cross-Linking Experimente nach der <u>H</u> <u>i</u> <u>s</u> - <u>P</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>n</u> - <u>I</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>k</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u> - <u>E</u> <u>x</u> <u>p</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> (HPINE)-Methode: Interaktion von NreA mit NreB	89
5. Diskussion	92
5.1 Zusammenhang zwischen Wachstum und Expression der Komponenten der Nitratatmung in Abhängigkeit von NreABC	92
5.2 NreA – ein GAF-Domänen Protein mit Nitratrezeptorfunktion	94
5.2.1 Physiologische Relevanz der Bindung von Nitrat und Iodid in NreA	94
5.2.2 Vergleich von NreA mit anderen GAF-Domänen-Proteinen	95
5.3 Vergleich mit anderen Nitratbindepoteinen - NreA ist ein neuartiger Nitratrezeptor	97
5.4 NreA interagiert mit NreB und bildet einen NO ₃ ⁻ /O ₂ -Sensorkomplex	99
5.5 Mögliche Flächen zur Dimerisierung von NreA und zur Interaktion mit NreB	100
5.5.1 Dimerisierungsformen von GAF-Domänen	100
5.5.2 Ligandenbindung bewirkt Konformationsänderungen von GAF-Domänen	103
5.5.3 Mögliche Flächen von NreA zur Proteininteraktion	105
5.6 Mutationen in NreA betreffen Ligandenbindung, Konformationsänderung und Signalweitergabe der regulatorischen Funktion	106
5.6.1 Mutationen in der Nitratbindetasche von NreA	107
5.6.2 NreA-Mutationen in der Peripherie	109
5.6.2.1 OFF-Mutanten hemmen NreBC dauerhaft durch Fixierung von NreA in der offenen, nitratfreien Konformation	109
5.6.2.2 ON-Mutanten verlieren ihre Repressorfunktion durch Blockierung von NreA in der nitratgebundenen Konformation oder Veränderung der Interaktionsfläche	110
5.7 Modell zur Kontrolle der Funktion von NreBC durch NreA	111
6. Literatur	113
Anhang	
Lebenslauf	
Veröffentlichungen	
Danksagung	

1. Zusammenfassung

Staphylococcus carnosus ist ein fakultativ anaerobes Bakterium, das aerobe Atmung, anaerobe Nitratatmung und Gärungsstoffwechsel betreiben kann. Die Expression des Nitratstoffwechsels wird durch das Dreikomponentensystem NreABC reguliert.

Unter anaeroben Bedingungen besitzt die Sensorhistidinkinase NreB in ihrer PAS-Domäne ein $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster. Das aktive (anaerobe) $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -NreB überträgt nach Autophosphorylierung die Phosphorylgruppe auf den Antwortregulator NreC, welcher dann die Expression der Gene der Nitratatmung aktiviert. Nitrat wirkt mit Hilfe des NreA-Proteins auf diese Gene induzierend. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass NreA ein GAF-Domänen-Protein und ein neuartiger Nitratrezeptor ist.

Die Natur von NreA als GAF-Domänen-Protein bestätigte sich beim Vergleich der Kristallstruktur mit denen anderer GAF-Domänen. GAF-Domänen sind weit verbreitet und binden typischer Weise kleine Moleküle. Als physiologischer Ligand von NreA zeigte sich Nitrat, das innerhalb einer definierten Bindetasche gebunden wird. NreA bindet vermutlich in dimerer Form an dimeres NreB und inhibiert dadurch die Phosphorylierung der Sensorhistidinkinase NreB. Die Interaktion von NreA mit NreB wurde *in vivo* durch BACTH-Messungen und sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durch Cross-Linking Experimente gezeigt. Nitrat reduziert den Ergebnissen nach die Interaktion von NreA mit NreB.

Durch Sequenzvergleiche von NreA mit Homologen wurden konservierte Aminosäuren identifiziert. Über gerichtete Mutagenese wurden 25 NreA-Varianten hergestellt und bezüglich ihres Verhaltens in Abhängigkeit von Nitrat in *narG-lip*-Reporterstudien getestet. Anhand ihres Phänotyps wurden sie als Wildtyp, ΔNreA - und ΔNreABC -Mutanten klassifiziert. Die Nitratbindetasche war in sechs Fällen betroffen. Die Phänotypen der Mutationen in der Peripherie lassen sich mit Auswirkungen auf die vermutete Konformationsänderung oder auf die Interaktion mit NreB erklären. Mutationen von konservierten, oberflächenexponierten Resten führten vermehrt zu $\Delta\text{NreA/ON}$ -Varianten. Es ließen sich Bereiche auf der Proteinoberfläche identifizieren, die für NreA/NreA- oder NreA/NreB-Interaktionen wichtig sein könnten.

Die Untersuchungen zeigten, dass NreA mit NreB interagiert und dass dadurch ein NreA/NreB-Sensorkomplex für die gemeinsame Erkennung von Nitrat und Sauerstoff gebildet wird.

1. Abstract

Staphylococcus carnosus is a facultative anaerobic bacterium. It is able to use oxygen and nitrate for respiration, and performs fermentation in the absence of a terminal electron acceptor. *S. carnosus* employs the regulation of the three-component system NreABC (nitrate regulation element) for expression of the nitrate respiration.

Under anaerobic conditions the sensor histidine kinase NreB contains a $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -cluster. The active (anaerobic) $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -NreB transfers a phosphoryl group to its cognate response regulator NreC after autophosphorylation. Then, NreC-P induces the transcription of the genes for dissimilatory nitrate reduction. In the presence of nitrate the level of gene expression is stimulated due to NreA. In the present work NreA was identified as GAF domain containing protein and as a new type of nitrate receptor.

By comparison of the NreA crystal structure with those of other GAF-domains, the postulated GAF-domain could be confirmed. GAF-domains are wide-spread and typically bind small molecules. Nitrate was identified as the physiological ligand of NreA. It binds inside a well-defined binding pocket. Presumably NreA binds to dimeric NreB as a dimer and inhibits the autophosphorylation of the sensor histidine kinase NreB. The interaction of NreA with NreB was shown *in vivo* with BACTH-measurements, and *in vivo* and *in vitro* with cross-linking experiments. Upon nitrate binding, the interaction of NreA with NreB is reduced.

Conserved amino acid residues were identified based on sequence alignments of NreA with homologue proteins. 25 variants of NreA were created by site-directed mutagenesis. They were tested towards their response to nitrate in *narG-lip*-reporter gene studies. The NreA variants were classified according to their respective phenotype as wildtype, ΔNreA -, and ΔNreABC -mutants. 6 variants effected directly the nitrate binding pocket. In the periphery, mutations seem to effect the supposed conformational change or alternatively the interaction with NreB. Most of the mutated residues causing a $\Delta\text{NreA/ON}$ -phenotype are located on the surface. On the protein surface distinct areas were detected that may be important for NreA/NreA or NreA/NreB-interactions.

The present studies reveal that NreA interacts with NreB in a way that a combined NreA/NreB sensor complex is formed which recognizes nitrate and oxygen.

2. Einleitung

2.1 Sensoren in Bakterien

Bakterien zeichnen sich durch ihre sehr hohe Adaptationsfähigkeit aus. Die aktuell vorherrschenden und oft zeitlich fluktuierenden Umweltfaktoren werden fortlaufend registriert und mit schneller Anpassung beantwortet. Zu diesem Zweck verfügen Bakterien über zahlreiche Sensorsysteme, die die Umweltbedingungen wahrnehmen. Diese werden in ein entsprechendes Signal auf molekularer Ebene umgewandelt, das den Stoffwechsel veranlasst sich zeitnah auf die gegebenen Bedingungen einzustellen. In der Regel benötigt ein Bakterium zahlreiche, unterschiedliche Sensorsysteme, welche auf verschiedenste Elemente oder Komponenten des umgebenen Milieus spezifisch ansprechen. Dazu gehören zum Beispiel Nährstoffangebot, Energieressourcen oder auch Stressfaktoren, wie Hitze, osmotischer Druck, drastische Veränderungen des pH-Wertes und oxidativer Stress. Alle wahrnehmbaren Informationen werden auf komplexe Art und Weise verarbeitet und bewirken durch Induktion oder Repression relevanter Zielgene eine Antwort auf der Transkriptionsebene. Die Summe aller durch die Rezeptoren eingespielten Informationen ergibt dann letztendlich ein kombiniertes Signal, das beispielsweise dazu führt, dass ein spezieller Stoffwechselweg an- oder abgeschaltet wird.

Gerade die Wahrnehmung von Energiequellen, wie Glukose und von Elektronenakzeptoren, wie Sauerstoff oder Nitrat, die für die Energiekonservierung benötigt werden, ist von besonderer Bedeutung für die Vitalität eines Organismus. Nur durch die Wahl des entsprechend optimalen Stoffwechselweges wird ein optimaler Energiehaushalt gewährleistet.

Beim Enterobakterium *Escherichia coli* ist die Auswahl der Energiestoffwechselwege gut untersucht (Gunsalus *et al.* 1992; Unden und Bongaerts, 1997). *E. coli* kann Energie aus aerober und anaerober Atmung, sowie aus Gärungsstoffwechsel beziehen. Um eine maximale ATP-Ausbeute zu erhalten, besteht eine klare hierarische Struktur unter den Stoffwechselwegen. Die aerobe Atmung wird der anaeroben Atmung und diese der Gärung gegenüber bevorzugt (Unden und Trageser, 1991). Zur Regulierung sind Sensoren für Sauerstoff und für alternative Elektronenakzeptoren, wie Nitrat, nötig. Solche Sensorsysteme sind daher in Bakterien weit verbreitet (Green *et al.*, 2009; Unden *et al.*, 2010).

2.2 Regulation des Energiestoffwechsels in *E. coli* durch Sauerstoff und Nitrat

Sauerstoffsensoren erkennen die Verfügbarkeit von Sauerstoff und deren Konzentrationsänderungen und sind in Bakterien weit verbreitet (Green *et al.*, 2009; Uden *et al.*, 2010). Sie regulieren die Expression der entsprechenden Gene für die aerobe Atmung und für die Konkurrenzstoffwechselwege, wie die anaerobe Atmung.

In *E. coli* erfolgt eine direkte Sauerstoffperzeption über FNR (Fumarat-Nitratreduktase-Regulator) und eine indirekte über ArcBA (Aerobic Respiratory Control) (Abbildung 2.1). FNR_{red} ist im Anaeroben aktiv. Es aktiviert die Genexpression der anaeroben Atmung (Dehydrogenasen, Fumaratreduktase, Nitratreduktase, DMSO-Reduktase) und reprimiert die aerobe Atmung. Die Wahrnehmung verläuft über den sauerstoffempfindlichen Cofaktor, ein [Fe₄S₄]²⁺-Cluster. Dieses zerfällt, wenn Sauerstoff anwesend ist, sodass FNR_{ox} (apoFNR) inaktiv wird (Uden und Trageser, 1991; Shaw und Guest, 1982; Uden und Schirawski, 1997).

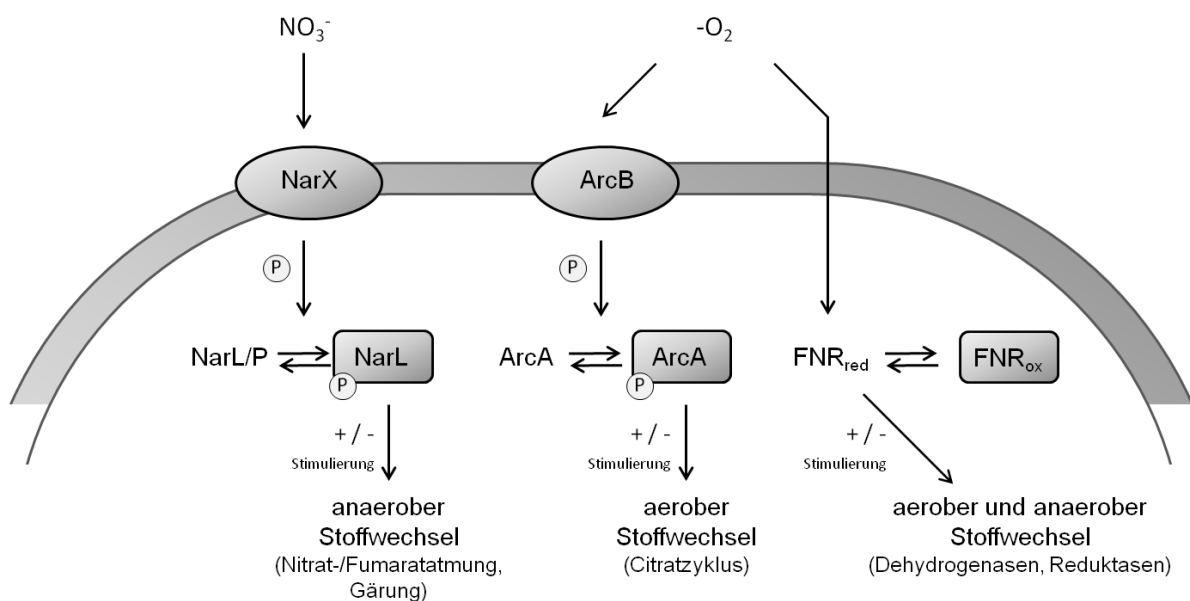


Abbildung 2.1: Sauerstoff und Nitrat als Regulatoren des Energiestoffwechsels von *E. coli*. Die Expression wichtiger Stoffwechselschritte der aeroben und anaeroben Atmung, sowie der Gärung werden durch die Sauerstoffregulatorsysteme FNR und ArcBA, sowie durch das Nitratregulatorsystem NarXL kontrolliert. Durch Integration der verschiedenen stimulierenden und hemmenden Effekte ergibt sich die Expression der Zielgene.

ArcBA misst den Redoxzustand des Chinonpools und reprimiert den aeroben Stoffwechsel (Zitratzyklus) unter Anaerobiose (Iuchi *et al.*, 1988; Bekker *et al.*, 2009).

ArcBA stellt damit ein klassisches Sensorsystem, ein Zweikomponenten-System, dar. Ein Zweikomponenten-System besteht aus einer Sensorhistidinkinase, die oft membranständig ist und einem Antwortregulator (Responseregulator). Die Sensorhistidinkinase nimmt einen spezifischen Umweltreiz wahr. Durch Autophosphorylierung an einem konservierten Histidin-Rest geht sie nach Reizwahrnehmung in einen aktivierten Zustand über, aus dem heraus die

Phosphorylgruppe auf einen konservierten Aspartatrest am Antwortregulator übertragen werden kann. Die Reizinformation wird dadurch an den Antwortregulator weitergegeben und dieser beeinflusst daraufhin seinerseits die Transkription der Zielgene.

NarXL ist ebenfalls ein Zweikomponenten-System (Williams und Stewart, 1997; Cheung und Hendrickson, 2009). Es erkennt die Anwesenheit von Nitrat und Nitrit, wodurch die Expression der Gene für die anaerobe Respiration (Dehydrogenase) und für die Nitratreduktase aktiviert wird. Parallel wird durch NarXL die Expression alternativer Reduktasen (Fumaratreduktase, DMSO-Reduktase) und des Gärungsstoffwechsels reprimiert (Abbildung 2.1).

NarXL ist demnach in *E. coli* zusammen mit den Sensorsystemen FNR und ArcBA für eine Hierarchie der Energiestoffwechselsysteme verantwortlich. Zusammen generieren sie eine komplexe Antwort, da die Zielpromotoren oft von mehreren Regulatoren gleichzeitig beeinflusst werden.

2.3 Sauerstoffregulatoren in Staphylococcen

Sauerstoffregulatoren sind auch in Staphylococcen bekannt. Sauerstoff abhängige Sensorsysteme kontrollieren ebenfalls den Wechsel von aerober zu anaerober Atmung. Das SrrBA-Zweikomponentensystem (Staphylococcus respiratory response) erkennt Sauerstoff vermutlich indirekt (Pragman *et al.*, 2004). Durch Hemmung beziehungsweise Induktion der Expression spezieller Gene, die für den Zitronensäurezyklus und die Gärung, sowie für die Ausbildung von Virulenzfaktoren nötig sind, wird der Stoffwechsel auf ähnliche Weise koordiniert, wie bei *E. coli* (Ulrich *et al.*, 2007; Throup *et al.*, 2001).

Rex (Redox-Regulator), zuerst für *Streptomyces coelicolor* beschrieben, erfasst das Verhältnis von $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$ in der Zelle und reprimiert die Transkription von Proteinen der Atmungskette bei niedriger $\text{NADH}+\text{H}^+$ -Konzentration (Brekasis und Paget, 2003). Rex ist ein in Gram-positiven Bakterien verbreiteter Regulator und auch *S. carnosus* verfügt über ein Rex-homologes Protein.

NreBC (Nitratregulation, früher: nitrogen regulation) stimuliert unter Anaerobiose die Expression der Proteine, die an der anaeroben Nitratatmung beteiligt sind und ist bei *S. carnosus* und Verwandten bekannt (Fedtke *et al.*, 2002; Schlag *et al.*, 2008).

2.4 Sauerstoffabhängige Nitratatmungs-Regulation in *S. carnosus* durch NreBC

S. carnosus ist wie *E. coli* ein fakultativ anaerobes Bakterium und in der Lage neben aerober Atmung, auch anaerobe Atmung und Gärungsstoffwechsel zu betreiben. Für die anaerobe Atmung dient Nitrat als Elektronenakzeptor (Abbildung 2.2).

NreBC ist ein cytoplasmatisches Zweikomponentensystem und aktiviert unter Anaerobiose die Expression der Nitritreduktase NirRBD, der Nitratreduktase NarGHI und des

Nitrattransporters NarT (Fedtke *et al.*, 2002, Kamps *et al.*, 2004). NreB ist die Sensorhistidinkinase mit N-terminaler Sensordomäne und C-terminaler Histidinkinasedomäne und NreC der zugehörige Antwortregulator.

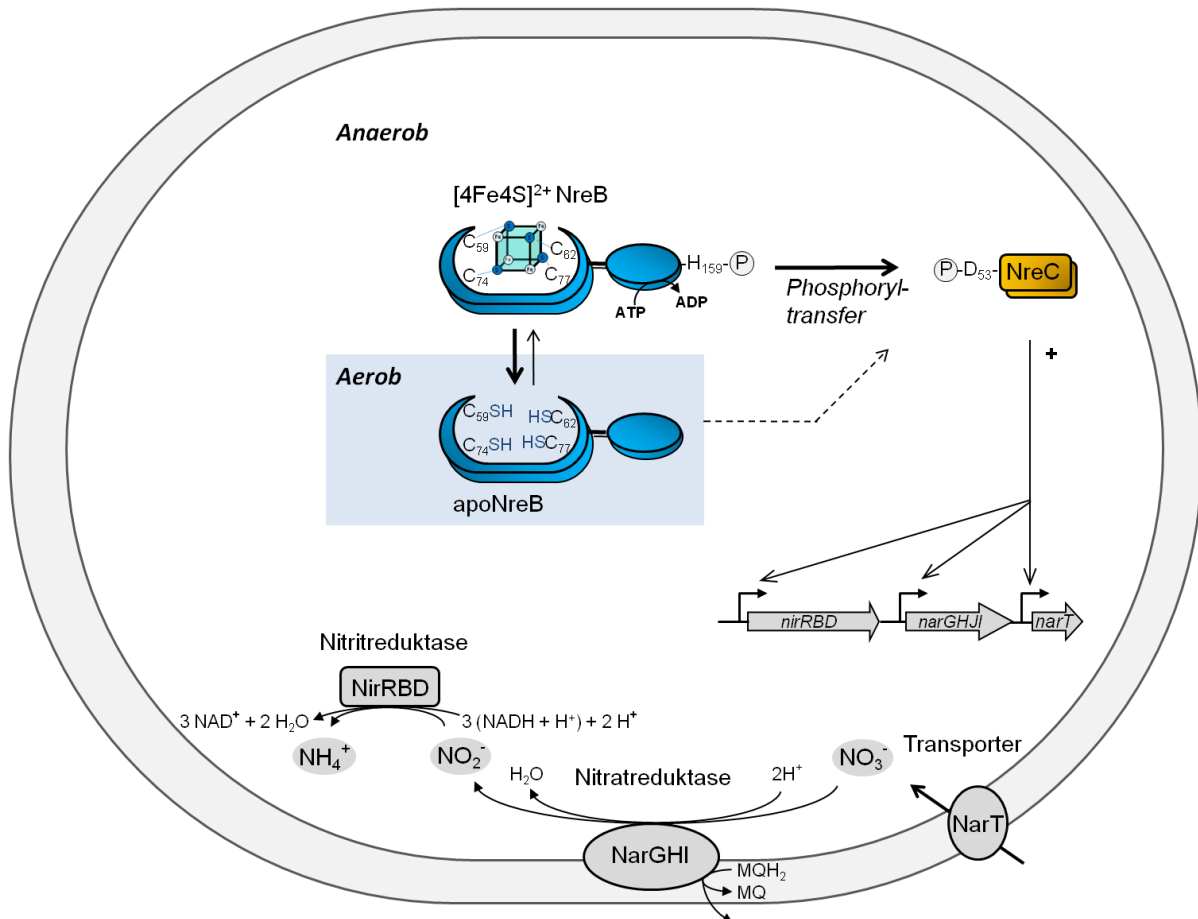


Abbildung 2.2: Regulation und Ablauf der Nitratatmung in *S. carnosus*. Im Aeroben besitzt der direkte Sauerstoffsensoren NreB ein [Fe₄S₄]²⁺-Zentrum und kann den Regulator NreC aktivieren. NreC induziert die Expression der Gene für den Nitrattransporter NarT, die membranständige Nitratreduktase NarGHI und die cytoplasmatische Nitritreduktase (NirRBD). Durch diese Komponenten wird Nitrat in die Zelle transportiert und anschließend zu Nitrit und weiter zu Ammonium reduziert. Anaerob ist NreB inaktiv und der Prozess läuft nicht ab.

NreB ist ein direkter Sauerstoffsensoren mit einem [Fe₄S₄]²⁺-Cluster in der Sensordomäne, welcher nur in Abwesenheit von Sauerstoff aktiv ist. Das [Fe₄S₄]²⁺-Cluster mit kubischer Form wird durch vier konservierte Cysteinreste (C59, C62, C74 und C77) koordiniert (Müllner *et al.*, 2008). Bei Sauerstoffanwesenheit zerfällt das [Fe₄S₄]²⁺-Cluster zu einem [Fe₂S₂]²⁺-Cluster, welches bei weiterer Sauerstoffexposition auch zerfällt und es entsteht apoNreB. Das resultierende apoNreB und das [Fe₂S₂]²⁺-NreB sind inaktiv (Reinhart, 2010) bezüglich der Autophosphorylierung und der Phosphorylierung von NreC.

Demnach wird NreC nur unter anaeroben Bedingungen durch NreB phosphoryliert und bindet in diesem Zustand (NreC-P) als positiver Transkriptionsfaktor an die spezifischen, GC-reichen, palindromischen DNA-Sequenzen der Zielpromotoren von *nirR*, *narG* und *narT*

(Fedtke *et al.*, 2002). Die Nitrit- und Nitratreduktase (NirRBD, NarGHI), sowie der Nitrattransporter (NarT) werden exprimiert.

Bei Anwesenheit von Nitrat, wird dieses aus der Umwelt in die Bakterienzelle durch NarT (Fast *et al.*, 1996) importiert. Die membranassoziierte Nitratreduktase NarGHI reduziert Nitrat zu Nitrit (Neubauer und Götz, 1996; Pantel *et al.*, 1998). Dabei wird ein Protonengradient aufgebaut, welcher der respiratorischen Energiekonservierung dient. Nitrit wird von der im Cytoplasma lokalisierten, dissimilatorischen Nitritreduktase NirRBD weiter zu Ammonium umgesetzt unter gleichzeitiger Regeneration von NAD⁺ (Neubauer *et al.*, 1998; Neubauer *et al.*, 1999). Der zweite Schritt trägt nicht zum Aufbau eines Protonengradienten bei (Schlag *et al.*, 2008).

2.5 NreA – ein GAF-Domänen Protein mit unbekannter Funktion

Die Gene *nreB* und *nreC* liegen auf einem gemeinsamen Operon *nreABC* (Fedtke *et al.*, 2002) (Abbildung 2.3). Auf diesem befindet sich mit *nreA* ein drittes Gen (Fedtke *et al.*, 2002; Uden *et al.*, 2013), welches für das Protein NreA codiert. Dessen Funktion ist bislang unbekannt, wobei bereits gemutmaßt wurde, dass es an der Nitrat- und Nitrit-Erkennung beteiligt sein könnte (Fedtke *et al.*, 2002).



Abbildung 2.3: Operonstruktur von *nreABC* in *S. carnosus*. Die Gene *nreB* und *nreC*, die für das Zweikomponentensystem NreBC codieren, befinden sich auf einem gemeinsamen Operon. Auf demselben Operon befindet sich mit *nreA* ein drittes Gen, welches für NreA codiert. Für NreA wird eine Funktion als Nitratsensor vermutet.

NreA besteht aus 155 Aminosäuren und ist ein cytoplasmatisches Protein. Laut Sekundärstrukturvorhersagen handelt es sich nicht um ein Multidomänen-Protein, sondern besitzt lediglich eine GAF-Domäne (Huang *et al.*, 1993; Anantharaman *et al.*, 2001; Fedtke *et al.*, 2002; Schlag *et al.*, 2008).

Benannt ist die GAF-Domäne nach den drei zuerst beschriebenen Proteinen mit solch einer Domäne: cGMP-spezifische Cyclische-Nukleotid-Phosphodiesterase, Adenylatzyklase und EhIA, einem Transkriptionsfaktor aus *E. coli* (Aravind und Ponting, 1997). Die Namenszusammensetzung reflektiert zugleich die Diversität an Funktionen von GAF-Domänen, welche sich auch in der Variabilität der Primärsequenzen widerspiegelt (Aravind und Ponting, 1997). Typischerweise haben GAF-Domänen aber die Funktion eines Sensors und Signalüberträgers (Zoraghi *et al.*, 2004).

Sie binden eine ganze Bandbreite kleiner Moleküle, wie cGMP, cAMP, Tetrapyrrole wie Bilin und Häm, oder Moleküle wie Acetat, Methylsulfoxid und 2-Oxoglutarat (Aravind und Ponting,

1997; Ho *et al.*, 2000; Anantharaman *et al.*, 2001; Zoraghi, *et al.*, 2004; Little *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Stein *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2008).

Die bislang gut untersuchten GAF-Domänen sind in der Regel Teile von Multidomänen-Proteinen und kommen häufig, vor allem bei Phosphodiesterasen, als Tandem-Strukturen vor (Martinez *et al.*, 2002). Das Beispiel der GAF-Domäne in der Methionin-(R)-sulfoxidreduktase fRMSr in *E. coli* (Lin *et al.*, 2007) verdeutlicht darüber hinaus, dass GAF-Domänen auch über katalytische Funktionen verfügen und sehr wohl als Einzeldomänen-Protein vorkommen können.

Eine GAF-Domäne besteht strukturell meist aus einer zentralen antiparallelen β -Faltblattstruktur, welche auf der einen Seite von zwei bis vier α -Helices und auf der anderen Seite aus einem Mix von kürzeren α -Helices und Schleifen (*loops*) flankiert wird. Letztere formen die Ligandenbindetasche der Domäne (Martinez *et al.*, 2002). Häufig ist in GAF-Domänen ein stark konserviertes NKFDE-Motiv zu finden, vor allem in der regulatorischen GAF-Domäne von Phosphodiesterasen (McAllister-Lucas *et al.*, 1995; Turko *et al.*, 1996). Zwar ist es nicht direkt bei der Liganden-Bindung (von cNMP) beteiligt, aber es zeigte sich als essentiell für die Faltungsstabilität dieser GAF-Domänen-Gruppe (Heikaus *et al.*, 2010).

Eine schematische Anordnung der Sekundärstrukturelemente der GAF-Domäne von DosT (Podust *et al.*, 2008) ist in Abbildung 2.4 gezeigt. DosT ist ein signalweiterleitendes Protein und koordiniert permanent ein Häm in der GAF-Domäne, ähnlich wie das Phytochrom Cph1 aus *Synechocystis sp.* PCC6803 dauerhaft einen Bilin-Cofaktor assoziiert hat (Yeh *et al.*, 1997; Hübschmann *et al.*, 2001; Essen *et al.*, 2008).

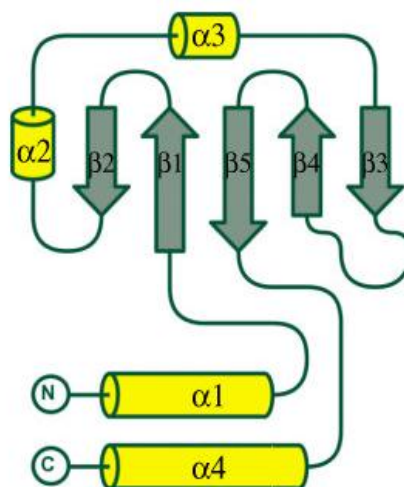


Abbildung 2.4: Sekundärstrukturelemente der GAF-Domäne von DosT aus *Mycobacterium tuberculosis* (Podust *et al.*, 2008). Das Protein besitzt vier α -Helices und fünf zentrale β -Faltblätter, die antiparallel angeordnet sind. Die GAF-Domäne bindet dauerhaft ein Häm-Molekül.

Die GAF-Domäne, die NreA zugesprochen wird, könnte theoretisch eine solche sensorische, regulatorische und/oder signaltransferierende Funktion besitzen, wie es für GAF-Domänen charakteristisch ist (Aravind und Ponting, 1997).

2.6 Nitratabhängige Nitratatmungs-Regulation in *S. carnosus* durch NreA?

Neben Anaerobiose induzieren auch Nitrat und/oder Nitrit in *S. carnosus* die Synthese der Gene von der Nitrat- und der Nitritreduktase, sowie des Nitrattransporters (Fedtke *et al.*, 2002). Das Protein, mit dem *S. carnosus* Nitrat wahrnimmt, wurde bislang noch nicht identifiziert, auch wenn mit dem NreA-Protein bereits ein möglicher Kandidat vorgestellt wurde (Fedtke *et al.*, 2002). Bekannte Nitratrezeptoren, die in anderen Organismen vorkommen, fehlen in *S. carnosus* (Niemann *et al.*, 2013). Es sind keine Gene vorhanden die für ein homologes Protein von NarX aus *E. coli* und anderen Proteobakterien (Williams und Stewart, 1997; Cheung und Hendrickson, 2009) oder für die Nitratsensoren NrtA und NasR codieren. NrtA ist ein periplasmatisches Protein des Cyanobakteriums *Synechocystis sp.* (Koropatkin *et al.*, 2006). NasR ist ein cytoplasmatisches RNA-Bindeprotein und ein translationaler Regulator (Boudes *et al.*, 2012).

Es ist jedoch anzunehmen, dass *S. carnosus* wie andere Bakterien über einen Nitratsensor verfügt. Bei diesem muss es sich um ein bislang in anderen Organismen noch nicht identifiziertes Protein handeln, das möglicherweise einen neuartigen Mechanismus zur Wahrnehmung von Nitrat verwendet.

Ziel der Arbeit

Bis jetzt ist die Funktion des zusammen mit NreBC vorkommenden Proteins NreA nicht bekannt. Ob und wie NreA mit dem Sauerstoffsensorsystem NreBC in *S. carnosus* zusammenwirkt, ist ebenfalls ungeklärt.

NreA soll eine GAF-Domäne besitzen, die oftmals sensorische und regulatorische Aufgaben hat. GAF-Domänen binden häufig kleine Moleküle. Es ist möglich, dass NreA eine Funktion als Nitrat-/Nitritsensor über die Bindung von Nitrat in der GAF-Domäne wahrnimmt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von NreA in der Stoffwechselregulation von *S. carnosus* zu untersuchen.

Dazu sollten konservierte Aminosäurereste von NreA bioinformatisch identifiziert werden (vgl. Singenstreu, 2010). Mittels gerichteter Mutagenese sollten ausgewählte Aminosäurereste auf ihre funktionelle Bedeutung in der Stoffwechselregulation hin untersucht werden. Für alle so zu generierenden *S. carnosus* NreA-Mutanten sollte die physiologische Auswirkung von Nitrat-/abwesenheit unter anaeroben und aeroben Bedingungen in einem geeigneten Testsystem beleuchtet werden. Hier sollten

Reporterstudien mit einer NreABC-abhängigen *narG-lip*-Reporterfusion durchgeführt werden.

Des Weiteren sollte das Zusammenwirken von NreA mit den anderen beiden coexprimierten Proteinen NreB und NreC untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde Proteininteraktionsmessungen von NreA, NreB und NreC mit dem Bacterial Two Hybrid (BACTH)-System und zusätzlich *in vivo*- und *in vitro*-Cross-Linking Experimente durchgeführt.

Die komplexe Fragestellung zur Rolle von NreA als möglichen Nitratsensor und seinem Zusammenwirken mit NreBC in der Stoffwechselregulation von *S. carnosus* ist in Abbildung 2.5 nochmals schematisch zusammengefasst.

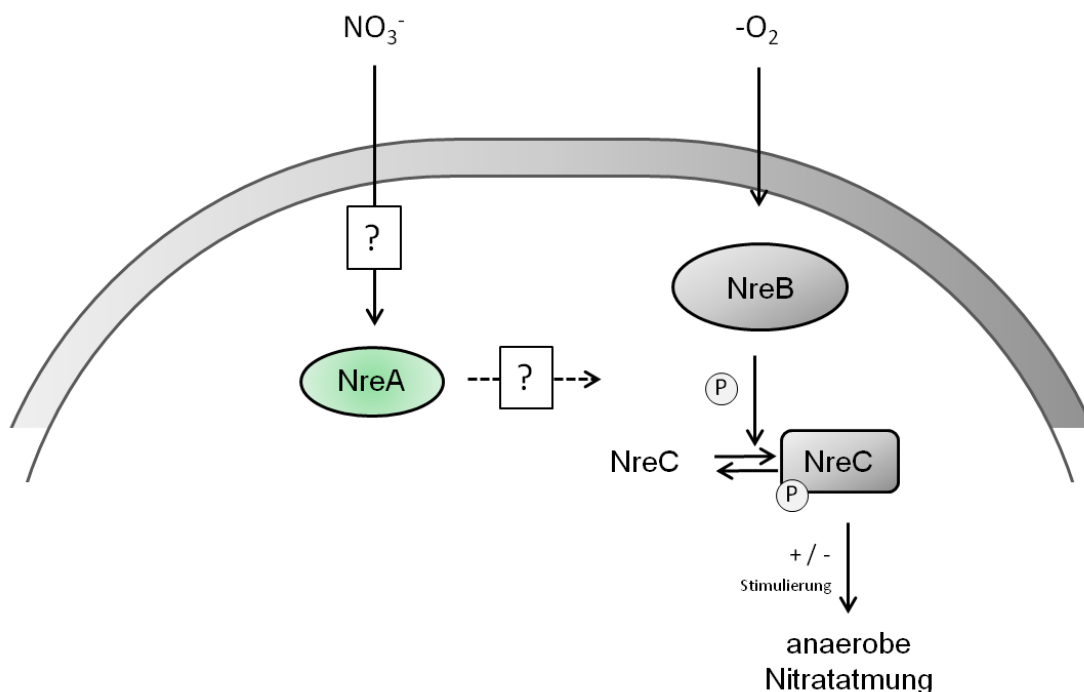


Abbildung 2.5: Hypothese zur Regulation der anaeroben Nitratatmung bei *S. carnosus*. Die Expression der Komponenten der Nitratatmung wird unter anaeroben Bedingungen durch das Sauerstoffregulatorsystem NreBC induziert. NreA wird als Nitratsensor postuliert, der sein Signal in das NreBC-System integriert.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Alle Bakterienstämme und Plasmide, die verwendet oder konstruiert wurden, sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle 3.1: Verwendete Stämme von *Escherichia coli* K12 und *Staphylococcus carnosus* TM300.

Stamm	Genotyp	Referenz oder Quelle
<i>S. carnosus</i> TM300	WT	Götz und Schuhmacher, 1987
<i>S. carnosus</i> m1	$\Delta nreABC::ermB$	Fedtke <i>et al.</i> , 2002
<i>S. carnosus</i> $\Delta nreA$	Deletion von <i>nreA</i> innerhalb des open reading frames	Schlag, 2008
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi-1, lac, [F', proAB, lacIqZΔM15, Tn10 (tet^R)]</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> M15	[[pREP4], <i>NaI^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺</i>	Quiagen
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi-1, $\Delta(lac-proAB)$, [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> BTH101	<i>Rec⁺, F- cya-99, araD139, galE15, galK16, hsdR2, mcrA1, mcrB1 rpsL1 (str^R),</i>	Karimova <i>et al.</i> , 1998

Tabelle 3.2: Verwendete Plasmide für Expressionsexperimente und Klonierungen.

Plasmid	Genotyp	Referenz oder Quelle
pMW1001	pPS44-Derivat mit <i>narG</i> -Promotor eingefügt über <i>BamHI</i> vor das <i>lip</i> -Gen	Nilkens <i>et al.</i> , 2013
pMW1040	pMW418-Derivat, <i>narG-lip</i> eingefügt über <i>SbfI</i> und <i>NheI</i> in selber Orientierung wie <i>nreABC</i> , <i>Cam^R</i>	Nilkens <i>et al.</i> , 2013
pMW1041	pMW418-Derivat, <i>narG-lip</i> eingefügt über <i>SbfI</i> und <i>NheI</i> in gegenläufiger Orientierung wie <i>nreABC</i> , <i>Cam^R</i>	Nilkens <i>et al.</i> , 2013
pMW1393	pMW1040-Derivat mit <i>nreA</i> -Deletion	Nilkens <i>et al.</i> , 2013

pKT25	C-terminales T25-Protein Fusionsplasmid, pSU40-Derivat, <i>Kan^R</i>	Karimova <i>et al.</i> 2005
pKNT25	N-terminal T25-Protein Fusionsplasmid, pSU40-Derivat, <i>Kan^R</i>	Karimova <i>et al.</i> 2005
pUT18C	C-terminales T18-Protein Fusionsplasmid, pUC19-Derivat, <i>Amp^R</i>	Karimova <i>et al.</i> 2005
pUT18	N-terminales T18-Protein Fusionsplasmid, pUC19-Derivat, <i>Amp^R</i>	Karimova <i>et al.</i> 2005
pT25-zip	T25-Zip Expressionsplasmid, pKT25 -Derivat, <i>Kan^R</i>	Karimova <i>et al.</i> 1998
pT18C-zip	T18-Zip Expressionsplasmid, pUT18C-Derivat, <i>Amp^R</i>	Karimova <i>et al.</i> 1998
pQE31 <i>nreA</i>	<i>nreA</i> mit His ₆ -tag (N-terminal), kloniert über Einbringung von <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III Restriktionsschnittstellen, dient zur Überexpression, IPTG induzierbarer Promotor, <i>Kan^R</i> , <i>Amp^R</i>	Schlag, 2008
pCQE1 <i>nreB</i>	Expressionsplasmid für Staphylococcen, <i>nreB</i> mit His ₆ -tag (C-terminal), <i>xyIA</i> Promoter durch Xylose induzierbar, durch Glukose reprimierbar, <i>Cam^R</i>	Fedtke <i>et al.</i> , 2002
pMW1192	pASK-IBA13plus-Derivat mit <i>nreB</i> kloniert über Einbringung von <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III Restriktionsschnittstellen, Strep-tag (N-terminal), <i>Amp^R</i>	Nilkens <i>et al.</i> , 2013
pMW1243	pASK-IBA13plus- Derivat mit <i>nreA</i> kloniert über Einbringung von <i>Xho</i> I und <i>Eco</i> RV Restriktionsschnittstellen, Strep-tag (N-terminal), <i>Amp^R</i>	Nilkens <i>et al.</i> , 2013
pMW1617	pASK-IBA13plus-Derivat mit <i>nreA</i> kloniert über Einbringung von <i>Bsa</i> I Restriktionsschnittstelle, Strep-tag (C-terminal), <i>Amp^R</i>	Nilkens <i>et al.</i> , 2013
pPS44	Plasmid für Staphylococcen, <i>lip</i> -Gen (<i>Staphylococcus hyicus</i>), pC194 origin, <i>Cam^R</i>	Peschel <i>et al.</i> , 1993
pMW400	<i>nreB</i> mit His ₆ -tag (C-terminal), kloniert über <i>Nco</i> I und <i>Hind</i> III in pet28a, <i>Kan^R</i>	Müllner, 2008
pRB473	<i>E. coli</i> / <i>S. carnosus</i> Shuttle-Vektor mit <i>Amp^R</i> für <i>E. coli</i> und <i>Cam^R</i> für <i>S. carnosus</i>	Brückner, 1992
pMW418	pRB473 mit <i>nreABC</i> und nativem Promotor	Müllner <i>et al.</i> , 2008

Tabelle 3.3: Mutageneseplasmide.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pMW1062	wie pMW1040, aber NreA(R21A)	Diese Arbeit
pMW1066	wie pMW1040, aber NreA(E101A)	Singenstreu, 2010
pMW1069	wie pMW1041, aber NreA(F28A)	Singenstreu, 2010
pMW1070	wie pMW1041, aber NreA(W45A)	Singenstreu, 2010
pMW1071	wie pMW1041, aber NreA(R55A)	Singenstreu, 2010
pMW1073	wie pMW1041, aber NreA(R126A)	Singenstreu, 2010
pMW1296	wie pMW1040, aber NreA(L67N)	Diese Arbeit
pMW1297	wie pMW1040, aber NreA(R62A)	Diese Arbeit
pMW1298	wie pMW1040, aber NreA(Y95A)	Diese Arbeit
pMW1299	wie pMW1040, aber NreA(Y47A)	Diese Arbeit
pMW1300	wie pMW1040, aber NreA(L121S)	Diese Arbeit
pMW1301	wie pMW1040, aber NreA(R57A)	Diese Arbeit
pMW1427	wie pMW1040, aber NreA(N51A)	Diese Arbeit
pMW1453	wie pMW1040, aber NreA(Q14A)	Diese Arbeit
pMW1454	wie pMW1040, aber NreA(D27A)	Diese Arbeit
pMW1455	wie pMW1040, aber NreA(R73A)	Diese Arbeit
pMW1456	wie pMW1040, aber NreA(Q125A)	Diese Arbeit
pMW1513	wie pMW1040, aber NreA(F28V)	Diese Arbeit
pMW1514	wie pMW1040, aber NreA(W45F)	Diese Arbeit
pMW1515	wie pMW1040, aber NreA(N51D)	Diese Arbeit
pMW1516	wie pMW1040, aber NreA(N53D)	Diese Arbeit

pMW1517	wie pMW1040, aber NreA(Y95L)	Diese Arbeit
pMW1518	wie pMW1040, aber NreA(E101Q)	Diese Arbeit
pMW1519	wie pMW1040, aber NreA(L122F)	Diese Arbeit
pMW1520	wie pMW1040, aber NreA(D27N)	Diese Arbeit
pMW1521	wie pMW1040, aber NreA(D18N-E19Q-E22Q-D27N)	Diese Arbeit
pMW1640	wie pMW1040, aber NreA(L38N)	Diese Arbeit
pMW1781	wie pMW1040, aber NreA(L67E)	Diese Arbeit
pMW2065	pKNT25-Derivat mit NreA(Y95A), <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW2078	pKT25-Derivat mit NreA(Y95A), <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW2079	pUT18-Derivat mit NreA(Y95A), <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW2080	pUT18C-Derivat mit NreA(Y95A), <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit

Tabelle 3.4: Konstruierte Plasmide für die BACTH-Interaktionsmessungen.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pMW1423	pKT25-Derivat mit <i>nreA</i> eingefügt über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i> , zur Expression von T25-NreA, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1424	pUT18C-Derivat mit <i>nreC</i> eingefügt über <i>XbaI</i> und <i>KpnI</i> , zur Expression von T25-NreC, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1425	pUT18C-Derivat mit <i>nreB</i> eingefügt über <i>XbaI</i> und <i>EcoRI</i> , zur Expression von T25-NreB, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1439	pKT25-Derivat mit <i>nreC</i> eingefügt über <i>XbaI</i> und <i>KpnI</i> , zur Expression von T25-NreC, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit

pMW1451	pUT18C-Derivat mit <i>nreA</i> eingefügt über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i> , zur Expression von T25-NreA, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1452	pKT25-Derivat mit <i>nreB</i> eingefügt über <i>XbaI</i> und <i>EcoRI</i> , zur Expression von T25-NreB, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1775	pKNT25-Derivat mit <i>nreA</i> eingefügt über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i> , zur Expression von T25-NreA, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1776	pKNT25-Derivat mit <i>nreB</i> eingefügt über <i>XbaI</i> und <i>EcoRI</i> , zur Expression von T25-NreB, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1777	pKNT25-Derivat mit <i>nreC</i> eingefügt über <i>XbaI</i> und <i>KpnI</i> , zur Expression von T25-NreC, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1778	pUT18-Derivat mit <i>nreA</i> eingefügt über <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i> , zur Expression von T25-NreA, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1779	pUT18-Derivat mit <i>nreB</i> eingefügt über <i>XbaI</i> und <i>EcoRI</i> , zur Expression von T25-NreB, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1780	pUT18-Derivat mit <i>nreC</i> eingefügt über <i>XbaI</i> und <i>KpnI</i> , zur Expression von T25-NreC, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit

Tabelle 3.5: Plasmidkonstrukte für *in vivo* Cross-Linking Experimente.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pMW1949	pBAD33-Derivat mit <i>nreA</i> inkl. RBS und His ₆ -tag aus pQE31 <i>nreA</i> über <i>Pst</i> I und <i>Hind</i> III, zur Überexpression von NreA-His ₆ (N-terminal), induzierbar durch Anhydrotetracyclin, <i>Cam</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1950	pBAD33-Derivat mit <i>nreB</i> inkl. RBS und His ₆ -tag aus pMW400 über <i>Xba</i> I und <i>Kpn</i> I, zur Überexpression von NreB-His ₆ (N-terminal), induzierbar durch Anhydrotetracyclin, <i>Cam</i> ^R	Diese Arbeit

Tabelle 3.6: Plasmidkonstrukt für *narG-lip*-Reportermessungen in *NreA*-Anwesenheit.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pMW1532	pMW1040-Derivat, <i>nreBC</i> deletiert auf Plasmid über Einfügung von <i>Bgl</i> II-Schnittstellen (in <i>nreB</i> nach 33bp, in <i>nreC</i> 9bp vom 5'-Ende aus)	Diese Arbeit

Tabelle 3.7: Plasmidkonstrukt für Messung der Promotorinduktion von *nreABC*.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pMW1782	pMW418-Derivat, aber Fusion aus nativem Promotor von <i>pnreABC</i> mit Lipasegen <i>lip</i> aus pPS44, entspricht: pRB473-[<i>pnreA-lip</i>]	Diese Arbeit

Tabelle 3.8: Mutageneseprimer für zielgerichtete Mutagenese in *nreA*.

Primer	Sequenz (5'-3')	T _m [°C]	Mutation
01_NreA-R21A-for	GCT TTG GAT GAA ATC <u>GCA</u> GAA ACA GAG	67	R21A
01_NreA-R21A-rev	CTC TGT TTC TGC GAT TTC ATC CAA AGC	67	R21A
02_NreA-F28A-for	CAG AGA AAT TTG ATG <u>CTG</u> CAG CGA TTG C	68	F28A

02_NreA-F28A-rev	GCA ATC GCT GCA GCA TCA AAT TTC TCT G	68	F28A
03_NreA-W45A-for	CGG TCA TTA AAG <u>CGA</u> AAT ATG CTT CCG G	68	W45A
03_NreA-W45A-rev	CCG GAA GCA TAT TTC GCT TTA ATG ACC G	68	W45A
04_NreA-R55A-for	CCG GCA ATA TCA ACT <u>ACG</u> <u>CTT</u> ATC GAA TG	69	R55A
04_NreA-R55A-rev	CAT TCG ATA AGC GTA GTT GAT ATT GCC GG	69	R55A
05_NreA-E101A-for	CGT TTT GAG <u>TGC</u> <u>AGC</u> ACT AAC AGC AAT GG	70	E101A
05_NreA-E101A-rev	CCA TTG CTG TTA GTG CTG CAC TCA AAA CG	70	E101A
06_NreA-R126A-for	GTT ATT AGG ACA <u>AGC</u> <u>AGA</u> AGG TCG TCC	68	R126A
06_NreA-R126A-rev	GGA CGA CCT TCT GCT TGT CCT AAT AAC	68	R126A
07_NreA-L67N-for	GAC CAG GAA AAG <u>GTA</u> <u>ATG</u> CTG GTC TG	67,9	L67N
07_NreA-L67N-rev	CAG ACC AGC ATT ACC TTT TCC TGG TC	67,9	L67N
08_NreA-L121S-for	GTT TAT GGT GCA <u>TCG</u> TTA TTA GGA CAA CGC G	70,9	L121S
08_NreA-L121S-rev	CGC GTT GTC CTA ATA ACG ATG CAC CAT AAA C	70,9	L121S
09_NreA-Y95A-for	GAC AAA TTA GGT <u>GCT</u> CCG ATT GTT TTG AG	67,4	Y95A
09_NreA-Y95A-rev	CTC AAA ACA ATC GGA GCA CCT AAT TTG TC	67,4	Y95A
10_NreA-Y47A-for	GGT CAT TAA ATG GAA <u>AGC</u> <u>TGC</u> TTC CGG	68,2	Y47A
10_NreA-Y47A-rev	CCG GAA GCA GCT TTC CAT TTA ATG ACC	68,2	Y47A
11_NreA-R57A-for	CTA CCG CTA <u>TGC</u> <u>AAT</u> GAT TGT TTT AAG	63,7	R57A
11_NreA-R57A-rev	CTT AAA ACA ATC ATT GCA TAG	63,7	R57A

	CGG TAG		
12_NreA-R62A-for	GAT TGT TTT <u>AGC ACC</u> AGG AAA AGG TTT GGC	69,2	R62A
12_NreA-R62A-rev	GCC AAA CCT TTT CCT GGT GCT AAA ACA ATC	69,2	R62A
13_NreA-N51A-for	GAA ATA TGC TTC CGG <u>CGC TAT</u> CAA CTA CCG C	73,8	N51A
13_NreA-N51A-rev	GCG GTA GTT GAT AGC GCC GGA AGC ATA TTT C	73,8	N51A
14_NreA-Q14A-for	CTT TGA TTA <u>CGC AGA</u> TGC TTT GGA TG	64,6	Q14A
14_NreA-Q14A-rev	CAT CCA AAG CAT CTG CGT AAT CAA AG	64,6	Q14A
15_NreA-D27A-for	CAG AGA AAT <u>TTG CTT</u> TTG CAG CGA TTG	65,3	D27A
15_NreA-D27A-rev	CAA TCG CTG CAA AAG CAA ATT TCT CTG	65,3	D27A
16_NreA-R73A-for	GGT CTG GTA ATT <u>GCA ACG</u> GGC TCT AG	69,5	R73A
16_NreA-R73A-rev	CTA GAG CCC GTT GCA ATT ACC AGA CC	69,5	R73A
17_NreA-Q125A-for	GTT ATT AGG <u>AGC ACG</u> CGA AGG TCG TC	69,5	Q125A
17_NreA-Q125A-rev	GAC GAC CTT CGC GTG CTC CTA ATA AC	69,5	Q125A
18_NreA-F28V-for	CAG AGA AAT TTG <u>ATG TTG</u> CAG CGA TTG C	67,2	F28V
18_NreA-F28V-rev	GCA ATC GCT GCA ACA TCA AAT TTC TCT G	67,2	F28V
19_NreA-W45F-for	GCG GTC ATT AAA <u>TTT</u> AAA TAT GCT TCC GG	66,2	W45F
19_NreA-W45F-rev	CCG GAA GCA TAT TTA AAT TTA ATG ACC	66,2	W45F
20_NreA-N51D-for	GAA ATA TGC TTC CGG <u>CGA TAT</u> CAA CTA CCG C	72,1	N51D
20_NreA-N51D-rev	GCG GTA GTT GAT ATC GCC GGA AGC ATA TTT C	72,1	N51D

21_NreA-N53D-for	CTT CCG GCA ATA TCG <u>ATT</u> ACC GCT ATC G	70,1	N53D
21_NreA-N53D-rev	CGA TAG CGG TAA TCG ATA TTG CCG GAA G	70,1	N53D
22_NreA-Y95L-for	GAC AAA TTA GGT <u>TTG</u> CCG ATT GTT TTG AG	66,2	Y95L
22_NreA-Y95L-rev	CTC AAA ACA ATC GGC AAA CCT AAT TTG TC	66,2	Y95L
23_NreA-E101Q-for	GTT TTG AGT <u>CAA</u> GCA CTA ACA GCA ATG G	67,2	E101Q
23_NreA-E101Q-rev	CCA TTG CTG TTA GTG CTT GAC TCA AAA C	67,2	E101Q
24_NreA-L122F-for	GTT TAT GGT GCA TTG <u>TTT</u> TTA GGA CAA CGC G	69,7	L122F
24_NreA-L122F-rev	CGC GTT GTC CTA AAA ACA ATG CAC CAT AAA C	69,7	L122F
25a_NreA-D27N-for	CAG AGA AAT TTA <u>ATT</u> TTG CAG CGA TTG C	64,4	D27N
25a_NreA-D27N-rev	GCA ATC GCT GCA AAA TTA AAT TTC TCT G	64,4	D27N
25b_NreA-D18N- E19Q-for (in Plasmid mit D27N)	CAA GAT GCT TTG <u>AAT CAA</u> ATC AGA GAA ACA G	66,8	D18N-E19Q- D27N
25b_NreA-D18N- E19Q-rev (in Plasmid mit D27N)	CTG TTT CTC TGA TTT GAT TCA AAG CAT CTT G	66,8	D18N-E19Q- D27N
25c_NreA- E22N-for (in Plasmid mit D18N- E19Q-D27N)	CAA ATC AGA <u>CAA</u> ACA GAG AAA TTT AAT GC	63,3	D18N-E19Q- E22N-D27N
25c_NreA- E22N-rev (in Plasmid mit D18N- E19Q-D27N)	GCA TTA AAT TTC TCT GTT TGT CTG ATT TG	63,3	D18N-E19Q- E22N-D27N
26_NreA-L38N-for	GCC AGA AGA TGG <u>AAA</u> TCA TAG TGC GGT C	70,1	L38N
26_NreA-L38N-rev	GAC CGC ACT ATG ATT TCC ATC TTC TGG C	70,1	L38N
27_NreA-L67E-for	GAC CAG GAA AAG <u>GTG</u> AAG	69,5	L67E

	CTG GTC TG		
27_NreA-L67E-rev	CAG ACC AGC TTC ACC TTT TCC TGG TC	69,5	L67E

Tabelle 3.9: Primer zur Konstruktion der BACTH-Konstrukte mit NreA, NreB und NreC.

Primer	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]	Schnittstelle
A_BamHI-for	CAT AAT AGT GAG <u>GGG ATC CGA</u> TGT TG	66,2	<i>Bam</i> HI
A_EcoRI-rev	GCG TTA ATA AAT CTT <u>GGA ATT CAT</u> CAC GG	66,2	<i>Eco</i> RI
B_XbaI-for	GGT TAG GGA GTT <u>CTA GAG</u> ATG AAA TC	64,2	<i>Xba</i> I
B_EcoRI-rev	CTT CAA CTT <u>GAA TTC</u> TCC TAT CGT TAA TC	64,6	<i>Eco</i> RI
C_XbaI-for	CTG ATT AAC <u>TCT AGA</u> AGA CTT TAA G	59,2	<i>Xba</i> I
C_KpnI-rev	CTT TAT CGA CAG <u>GTA CCA</u> AAA ATT C	60,9	<i>Kpn</i> I
pUT18nreA- for-2	TAT <u>GGA TCC</u> GAT GTT GAA TAG TGT AAT TGC	66,7	<i>Bam</i> HI
pUT18-nreA- rev	TAT <u>GAA TTC</u> CCC GGT TGC TTA TTG ATT TC	66,2	<i>Eco</i> RI
pUT18nreAaa- for	CTT GAG GGG GAG <u>AAA</u> GAT GTT GAG TAG TG	69,1	Insertion von AA damit
pUT18nreAaa- rev	CAC TAT TCA ACA TCT TTC TCC CCC TCA AG	69,1	<i>nreA</i> im ORF
pUT18nreB-for	TAT <u>TCT AGA</u> GAT GAA ATC AAT AAG CAA CCG	65,1	<i>Xba</i> I
pUT18nreB- rev	ATA <u>GAA TTC</u> TCA GTT ATT GGA ACT TCC AAT G	65,6	<i>Eco</i> RI
pUT18nreC- for	TAT <u>TCT AGA</u> G ATG AAG ATA GTG ATT GC	62,1	<i>Xba</i> I
pUT18nreC- rev	ATA <u>GGT ACC</u> TCA AGT AAC TTT TTC TTC	62,1	<i>Kpn</i> I

Tabelle 3.10: Primer zur Konstruktion von pMW1949 und pMW1950.

Primer	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]	Schnittstelle
nreA-PstI-for	TAT <u>CTG CAG</u> ATG AGA GGA TCT C	60,1	<i>PstI</i>
nreA-HindIII-rev	CCA <u>AGC TTC</u> AGC TAA TTA AGC TT	69,5	<i>HindIII</i>
nreB-XbaI-for	GAA TTG TGA GCG GAT AAC AAT TCC C <u>C</u> CTA G	70,9	<i>XbaI</i>
nreB-KpnI-rev	GCT TTG TTA <u>GGT ACC</u> GGA TCT CAG TGG TG	71,9	<i>KpnI</i>

Tabelle 3.11: Primer zur Konstruktion von pMW1532.

Primer	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]	Schnittstelle
nreBxBglII-for	CGT GAT AAA TTA CAA GAT <u>C</u> TA TTA ACG CAG	65,1	<i>BglII</i>
nreBxBglII-rev	CTG CGT TAA TAG ATC TTG TAA TTT ATC ACG	65,1	<i>BglII</i>
nreCxBglII-for	GAA AAA GTT ACT <u>A</u> GA <u>T</u> CT TTG ATG AAT TTT TGG	65,1	<i>BglII</i>
nreCxBglII-rev	CCA AAA ATT CAT CAA AGA TCT AGT AAC TTT TTC	65,1	<i>BglII</i>

Tabelle 3.12: Primer zur Konstruktion von pMW1782.

Primer	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]	Schnittstelle
Lip_XhoI_for	GGG ACT GGT TTA <u>CTC GAG</u> AAA CAA AAC	69,5	<i>XhoI</i>
Lip_BglII_rev	GTG CGC ATT <u>AAG ATC</u> TAG CGT TCA TC	66,6	<i>BglII</i>
XhoI-nreA-for	GGG AGA GAT GTT <u>GAC TCG</u> <u>AGT</u> AAT TGC TTC	70,8	<i>XhoI</i>
XhoI-nreA-rev	GAA GCA ATT ACT CGA GTC AAC ATC TCT CCC	70,8	<i>XhoI</i>
nreC-for	GAT GAA TTT TTG <u>AGA TCT</u> GTC GAT AAA G	62,7	<i>BglII</i>
nreC-rev	CTT TAT CGA CAG ATC TCA AAA ATT CAT C	62,7	<i>BglII</i>

Tabelle 3.13: Sequenzierungsprimer.

Primer	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]	Quelle
Seq_u_nreA	GGA GTG TTC CAT TAT CTT ATG C	58,4	Diese Arbeit
pBAD33_seq_for	TAG CGG ATC CTA CCT GAC GC	62,5	Parowatkin, 2012
pKT25-seq_for2	GCG ATT CGG TGA CCG ATT AC	59,3	Witan, 2012
pKNT25-seq_for	CAC ACA GGA AAC AG CTAT GAC	57,9	Witan, 2012
pUT18C-seq_for	CTG GAA ACG GTG CCG GCG TC	65,5	Witan, 2012
pUT18-seq_for	CCA AGC TTG CAT GCC TGC	58,2	Witan, 2012

3.2 Verwendete Medien zur Anzucht der Bakterien

3.2.1 Stammhaltung

Zur Aufbewahrung der konstruierten Stämme wurden diese in die Stammhaltung des Institutes für Mikrobiologie und Weinforschung, AG Uden, aufgenommen. Dafür wurde eine 5 ml Flüssigkultur mit einer Bakterienkolonie angeimpft, etwa 16 h inkubiert (aerob, 37 °C) und anschließend in 2 ml frischem Medium und 2 ml Glycerin (50% v/v) aufgenommen. Zwei Aliquots à 1 ml lagern in der Stammhaltung bei -80 °C.

3.2.2 Verwendete Medien

Medien und Lösungen, die steril zu verwenden waren, wurden autoklaviert oder bei Hitzeelabilität sterilfiltriert (0,2 µl-Filter). Sofern nicht anders erwähnt, wurde zur Herstellung destilliertes Wasser verwendet.

Für die Zucht von *E. coli* Stämmen wurden folgende Medien verwendet.

LB-Medium (Luria Bertani)	nach Bertani, 1951
Pepton aus Casein (Pepton Nr. 140, Gibco)	10 g/l
Hefeextrakt (Serva)	5 g/l
NaCl (Roth)	5 g/l
optional bei Festmedien: Agar-Agar (Roth)	15 g/l

Für die *in vivo* Cross-Linking Experimente wurde dem LB-Medium noch Glukose (100 mM, Roth) zugefügt. Bei BACTH-Messungen wurden folgende Komponenten addiert: Dimethylsulfoxid (20 mM, DMSO, Fluka) als Elektronenakzeptor, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (0,5 mM, IPTG, Fluka) als Induktor und optional Natriumnitrat (10 mM, Fluka). Für die qualitative Kontrolle der β-Galaktosidaseaktivität wurden KAXI-Platten (LB-

Agar mit Kanamycin, Ampicillin, 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal)) verwendet.

Zur Erholung nach Transformationen, wurde SOC-Medium verwendet.

SOC-Medium (Super Optimal Broth)		Sambrook und Russell (2001)
Pepton aus Casein (Pepton Nr. 140, Gibco)	20 g/l	
Hefeextrakt (Serva)	5 g/l	
NaCl (Roth)	0,584 g/l	
KCl (Roth)	0,19 g/l	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (Fluka)	2,03 g/l	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Roth)	2,46 g/l	
Glukose (Roth)	3,96 g/l	

Für die Zucht von *S. carnosus* Stämmen wurden folgende Medien verwendet.

BM-Medium (Basal Medium)		nach Götz und Schuhmacher, 1987
Pepton aus Casein (Pepton Nr. 140, Gibco)	10 g/l	
Hefeextrakt (Serva)	5 g/l	
NaCl (Roth)	5 g/l	
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (Roth)	1 g/l	
Glukose (Roth)	1 g/l	
optional bei Festmedien: Agar-Agar (Roth)	15 g/l	

Bei Zuchten für eine anschließende Lipaseexpressionsmessung wurde mBM-Medium (modifiziertes Basal Medium) verwendet. Die modifizierte Form von BM-Medium enthält kein Na₂HPO₄. Dieses führt zur Präzipitation im Lipasetestpuffer und behindert die Messung. Optional wurde Natriumnitrat (10 mM) addiert.

Für die qualitative Analyse der Lipaseexpression wurden Lipasetestplatten verwendet.

Lipasetestplatten	
Pepton aus Casein (Pepton Nr. 140, Gibco)	10 g/l
Hefeextrakt (Serva)	5 g/l
NaCl (Roth)	5 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (Roth)	1,0% (v/v)
Tween-20 (Roth)	1% (v/v)
NaNO ₃ (Fluka)	10 mM
Agar-Agar (Roth)	15 g/l

Die Aufnahme der Wachstumskurve von *S. carnosus* erfolgte in K-Medium. Dieses beinhaltet möglichst geringe Konzentrationen an Aminosäuren, erlaubt aber gleichzeitig noch ein gutes Wachstum. K-Medium (modifiziert, Krismer, 1999) setzt sich aus folgenden Einzellösungen in definierter Weise zusammen.

Lösung-1: Phosphatpuffer pH 7	
Na ₂ HPO ₄ (1M, Roth) /	20 mM
KH ₂ PO ₄ (1M, Roth)	

Der pH-Wert wurde mit dem pH-Meter (Electrode BlueLine 12 pH, SCHOTT) eingestellt unter Verwendung zweier Eichlösungen bei pH 4 und pH 7 (Roth).

Die einzeln angesetzten Pufferkomponenten wurden durch Erhitzen in Lösung gebracht und anschließend vereinigt.

Lösung-2: Kohlenstoffquelle	
Glukose (2 M, Roth)	10 mM

Lösung-3: 100x Salzlösung	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Roth)	20 g/l
NH ₄ Cl (Roth)	50 g/l
NaCl (Roth)	50 g/l

Lösung-4: 10x Aminosäurelösung	
L-Prolin (Serva)	30 g/l
L-Arginin-HCl (Roth)	30 g/l
L-Serin (Roth)	30 g/l
L-Valin (+NaOH) (Roth)	40 g/l
L-Threonin (Roth)	20 g/l
L-Leucin (+NaOH) (Sigma)	20 g/l
L-Cystein-HCl (Merck)	5 g/l
L-Glutamat (Roth)	5 g/l

Alle Aminosäurelösungen wurden als separate Stammlösungen angesetzt und gelagert. Teilweise müssen diese durch Alkalisierung mit Natronlauge in Lösung gebracht werden. Gleiche Volumina werden anschließend zur Lösung-4 vereinigt.

Lösung-5: 1000x Vitaminlösung

Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂ , Supelco)	100 mg/l
<i>p</i> -Aminobenzoesäure (Merck)	80 mg/l
Biotin (Vitamin H, Merck)	20 mg/l
Nicotinsäure (Sigma)	200 mg/l
Calcium-D-Panthenat (Vitamin B ₅ , Roth)	100 mg/l
Pyridoxamin-2 HCl (Vitamin B ₆ , Merck)	300 mg/l
Thiamindichlorid (Vitamin B ₁ , Roth)	200 mg/l
Riboflavin (Vitamin B ₂ , AppliChem)	200 mg/l

Lösung-6: 1000x Spurenelementlösung

FeCl ₂ x 4 H ₂ O (Merck)	1500 mg/l
ZnCl ₂ (Merck)	70 mg/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O (Fluka)	100 mg/l
Borsäure (ICN)	6 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O (Sigma)	190 mg/l
CuCl ₂ x 2 H ₂ O (Merck)	2 mg/l
NiCl ₂ x 6 H ₂ O (Merck)	24 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x H ₂ O (Fluka)	36 mg/l

Die Lösung-2, Lösung-4, Lösung-5 und Lösung-6 wurden sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt.

1000 ml fertiges K-Medium setzt sich wie folgt zusammen: 50 ml Lösung-1, 5 ml Lösung-2, 10 ml Lösung-3, 100 ml Lösung-4, 1 ml Lösung-5, 1 ml Lösung-6 und optional 10 mM Natriumnitrat. Nach dem Zusammengeben der Einzellösungen wurde das K-Medium ebenfalls im Kühlschrank gelagert.

3.2.3 Benötigte Antibiotika

Alle Antibiotikastammlösungen wurden sterilfiltriert und zum handwarmen, autoklavierten Medium hinzugefügt. Bei Verwendung von mehr als einem Antibiotikum wurde nur 50% der angegebenen Endkonzentrationen verwendet.

Die Stammlösungen und Endkonzentration sind in der Tabelle 3.14 angegeben.

Tabelle 3.14: Stammlösung und Endkonzentration verwendeter Antibiotika.

Antibiotikum	Stammlösung [g/l]	Endlösung [mg/l]
Ampicillin (Amp, Roth)	50	100
Kanamycin (Kan, Roth)	50	50
Chloramphenicol (Cam, Fluka)	20 (in Ethanol)	20 für <i>E. coli</i>
		10 für <i>S. carnosus</i>
Tetracyclin (Tet, Fluka)	30	15
Erythromycin (Ery, Fluka)	2,5 (in Ethanol)	2,5

3.3 Kultivierung der Bakterien

Über-Nacht-Kulturen wurden prinzipiell in Reagenzgläsern mit 5 ml Flüssigmedium und dem entsprechenden Antibiotikum in aerober Schrägschüttelkultur (Excella E24 Incubator Shaker Series, Brunswick Scientific) bei 37 °C gezüchtet. Bei Weiterverwendung der Über-Nacht-Kultur als Inokulum für eine Hauptkultur, wurden entsprechende Komponenten, wie zum Beispiel Nitrat, zugefügt und alle Zuchtbedingungen angepasst. Demnach wurde für eine anaerobe Zucht die Über-Nacht-Kultur als Standkultur im Brutschrank (Inkubator TR-1, Braun) gezüchtet.

Für **Lipaseexpressionsmessungen** wurden die Zellen einer Über-Nacht-Kultur zunächst durch Zentrifugation pelletiert (3.500 U/min, 5 min, RT) und in frischem Medium aufgenommen. So wurde bereits gebildete Lipase entfernt. Die Hauptkultur wurde anschließend auf eine Zelldichte OD_{578} von 0,1 (UV/Visible Spectrometer, Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) eingestellt. Eine Hauptkultur umfasste ein Volumen von 40 ml mBM-Medium mit Chloramphenicol mit oder ohne Natriumnitrat und wurde bei aerober Zucht in Schikanenkolben (300 ml) oder bei anaerober Zucht in gasdichten Müller-Krempelflaschen (125 ml; Bülach, Schweiz) inkubiert. Anaerobiose wurde durch Begasen mit Stickstoff (Reinheit >99,99%, Westfalengas; Begasung 3 x 15 sek) erreicht. Zum Entfernen der atmosphärischen Luft und der gelösten Gase wurde vor dem ersten und zwischen dem Begasen Vakuum angeschlossen (3 x 15 min, KNF-Neuberger Membranpumpe Laboport 44). Nach Erreichen von einer OD_{578} von 0,5 wurde die Zucht beendet und Zellüberstand durch Zentrifugation (12.000 x g, 5 min, RT; 5415 D, F45-24-11 Rotor oder miniSpin plus, F45-12-11-Rotor, Eppendorf) von den Zellen abgetrennt und bis zur Lipasequantifizierung kühl gelagert.

Für die **Überproduktion** von NreA-His₆ (pQE31-nreA) aus *E. coli* M15 wurde analog zum QIAgen Handbuch gearbeitet. Die Hauptkultur aus 500 ml LB-Medium wurde mit 2% Inokulum angeimpft und in 2 l-Schikanenkolben aerob (180 U/min) bei 30 °C gezüchtet. Die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte nach 2 - 3 Stunden. Weitere 4 - 5 Stunden später

wurden die Zellen geerntet (5.0000 x g, 4 °C, 30 min; 5403, 16F6-38 Rotor, Eppendorf). Zur Isolierung von NreA[NO₃]-His₆ wurde dem Medium 10 mM Natriumnitrat zugegeben und stündlich weiteres Natriumnitrat (10 mM) addiert.

Für die aerobe **Überproduktion** von NreB-His₆ (pCQE1nreB; Wieland *et al.*, 1995; Fedtke *et al.*, 2002) aus *S. carnosus* wurden nach Müllner (2008) fünf 2 l-Schikanenkolben mit je 480 ml BM-Medium und 6 ml Über-Nacht-Kultur aerob (180 U/min) bei 37 °C gezüchtet. Nach 5 Stunden wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 33 mM Xylose (Roth, frisch ansetzen) induziert. Die Zellernte erfolgte nach weiteren 6 Stunden Zucht.

Für Protein-Interaktionsstudien mit dem **BACTH-System** wurden die Zuchten in *deep well*-Platten (VWR) durchgeführt. Für Vor- und Hauptkultur wurde je ein *well* mit einem Kulturvolumen von 500 µl LB-Medium inklusive Ampicillin, Kanamycin, DMSO, IPTG und optional mit Natriumnitrat, verwendet. Zum Animpfen der Vorkultur wurde eine Kolonie von der Agarplatte nach 60 Stunden Wachstum (bei 30 °C) mit kleinen Porzellankügelchen (Retsch 323540005) in das *well* überführt. Nach 7 Stunden Wachstum wurde die Hauptkultur mit 1,5% der Vorkultur inokuliert und nach Erreichen einer OD₅₇₀ von 0,25 - 0,5 für den anschließenden β-Galaktosidase-Test verwendet. Die Zucht von Vor- und Hauptkultur erfolgte bei 30 °C stehend, ohne die *deep well*-Platte zu bewegen. Zusätzlich wurde die Hauptkultur im Anaerobentopf (OXOID) unter Stickstoffatmosphäre inkubiert.

Für die ***in vivo* Cross-Linking Experimente** wurde 400 ml Hauptkultur (LB-Medium mit Glukose, Ampicillin, Chloramphenicol und optional Natriumnitrat) mit 2,5% Über-Nacht-Kultur inokuliert. Die Zucht erfolgte aerob bei 37 °C in 2-l Schikanenkolben bei 180 U/min. Die Induktion der Plasmide erfolgte durch 200 ng/ml Anhydrotetracyclin (AHT, IBA-Solutions For Life Science für pASK-IBA13⁺-Derivate) und 0,01% Arabinose (Roth, für pBAD33-Derivate) bei einer OD₅₇₈ von 0,3 - 0,5. Anschließend wurde bis zu einer OD₅₇₈ von 1,3 - 1,5 weiter gezüchtet, bevor 0,6% (v/v) Formaldehyd zum chemischen Cross-Linken hinzugefügt wurden (20 min, 37 °C, Thermomixer Compact, Eppendorf).

3.4 Biochemische Methoden

Nach Zucht der Zellen und anschließender Ernte durch Zentrifugation (Beckman Avanti JE, JA10 Rotor, oder Beckman J2MC, JA14 Rotor, 5.000 U/min (Umdrehungen pro Minute), 30 min, 4 °C) wurden die Pellets bei -80 °C gelagert, oder direkt weiterverwendet.

3.4.1 Präparation der Proteine NreA, NreA[NO₃] und aerobem NreB

NreA und NreA[NO₃] wurden mittels Affinitätschromatographie über eine Nickel-NTA(Nitrilotriessigsäure)-Matrix analog des Standardprotokolls von Qiagen aufgereinigt. Nach Resuspension der geernteten Zellen in 16 ml Puffer A wurden sie mittels French Press (SLM-Aminco, 4 Durchläufe, 13,8x10⁷ kg·s⁻²·m⁻¹) aufgeschlossen. Anschließend wurden nicht

aufgeschlossene Zellen und Zellpartikel durch einen weiteren Zentrifugationsschritt abgetrennt (5403, 16F6-38 Rotor, Eppendorf, 8.000 rpm, 60 min, 4 °C, oder Heraeus® Biofuge Primo R, Fixed Angle Highconic™ Rotor, Thermo SCIENTIFIC). Der Überstand wurde auf eine mit Puffer A (9 ml) äquilibrierte Nickel-NTA-Säule gegeben (1,5 - 2 ml Nickel-NTA-Agarose). Der Durchfluss wurde aufgefangen und ein zweites Mal auf die Säule gegeben. Es wurde mit 13 ml Puffer B gewaschen und mit 8 - 9 ml Puffer C eluiert. Zur Präparation von NreA[NO₃]⁻ wurden 100 mM Natriumnitrat zu Puffer A und B, beziehungsweise 20 mM Natriumnitrat zu Puffer C gegeben.

Die NreB-Präparation erfolgte mit den gleichen Puffern, mit denen auch NreA isoliert wurde und nach dem Protokoll von Müllner, 2008. Nach Bestimmung des Zellnassgewichtes und Resuspension in Puffer A (2 ml Puffer A / g Zellnassgewicht) wurden die Zellen mit Glasperlen (Ø=0,1 mm, Roth; 4g / g Zellnassgewicht) in der Zelmühle (Vibrogen Vi-4) aufgeschlossen mit 4 Durchläufen à 2,5 min und jeweils ½ min Pause. Die Bindung an 3 ml mit 30 ml Puffer A äquilibrierte Nickel-NTA-Agarose erfolgte über Nacht bei 4 °C in zusätzlich 200 ml Puffer A. Anschließend wurde mit 20 ml Puffer B gewaschen und 12 ml Puffer C eluiert. Die erhaltenen Proteinausbeuten wurden nach Bradford (1976) ermittelt. Die Lagerung der Proteine erfolgte nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C.

Puffer A - Resuspensionspuffer	
NaCl (Roth)	0,3 M
Glycerin (Roth)	5% (v/v)
Imidazol (Roth)	0,01 M
Natriumphosphatpuffer pH 7,2 aus Na ₂ HPO ₄ (1M, Roth) / NaH ₂ PO ₄ (1M, Roth)	0,05 M

Puffer B - Waschpuffer	
NaCl	1 M
Glycerin	5% (v/v)
Imidazol	0,02 M
Natriumphosphatpuffer pH 7,2	0,05 M

Puffer C - Elutionspuffer	
NaCl	0,3 M
Glycerin	5% (v/v)
Imidazol	0,15 M
Natriumphosphatpuffer pH 7,2	0,05 M

3.4.2 Dialyse

Das Prinzip der Dialyse beruht auf dem Entfernen oder Austauschen von kleinen Molekülen oder Ionen durch Einfüllen einer Proteinprobe in einen gequollenen Acetylzelluloseschlauch (Roth 6,0, Ausschlussgrenze 8.000-10.000 Da), welcher nach Verschluss die Proteinprobe zurück hält, aber die kleinen Moleküle und Salze in den umgebenen Puffer entlang des Konzentrationsgefälles entweichen lässt.

Hier wurde das zur Elution verwendete Imidazol aus der Proteinprobe entfernt, da es bei anschließenden *in vitro* Cross-Linking-Experimenten oder bei der Gelfiltration störend wirken könnte. Es wurde für Puffer D das Zehnfache des Probenvolumens gewählt und über Nacht bei 4 °C dialysiert. Der Puffer wurde nach 16 und 18 Stunden getauscht.

Puffer D - Dialysepuffer	
NaCl	0,1 M
Glycerin	5% (v/v)
Natriumphosphatpuffer pH 7,2	0,05 M

3.4.3 *In vitro* Cross-Linking

Proteine, die miteinander Wechselwirkungen eingehen, müssen in räumlicher Nähe zueinander stehen und demnach auch ihre Aminosäurereste, die in die Umgebung zeigen. Beim Cross-Linking verwendet man chemische Agenzien um diese Aminosäurereste kovalent zu verknüpfen und folglich vorhandene Protein-Protein-Interaktion zu fixieren und nachweisbar zu machen. Formaldehyd (Methanal, Sigma), der einfachste Aldehyd, stellt einen der kleinsten Cross-Linker dar. Es modifiziert Proteine durch Reaktion mit vorhandenen Amidgruppen (Abbildung 3.1). Anschließend kann es zwei Proteine verbinden, die durch Protein-Protein-Interaktion wechselwirken, wie in dem Reaktionsschema in Abbildung 3.1 gezeigt ist. Isoliertes NreA, NreA[NO₃], NreB (aerob isoliert) und anaerob isoliertes NreB (von A. Kretzschmar gestellt) wurden in der Konzentration 0,5 µg/1 µl und 1% (v/v) Formaldehyd in einem 20 µl-Reaktionsansatz zusammengegeben und für 30 min bei 26 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2x SDS-Ladepuffer wurde die Reaktion getoppt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese) aufgetrennt und durch Western Blot und Immunreaktion mit Anti-NreA- und Anti-NreB-Serum analysiert.

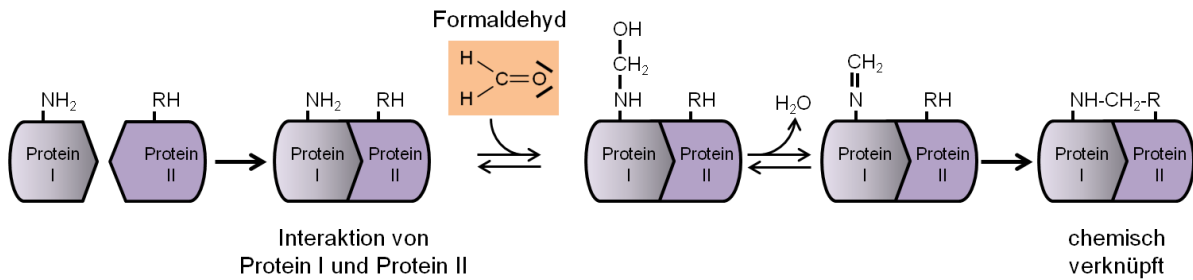


Abbildung 3.1: Chemische Verknüpfung zweier Proteine mit Formaldehyd in Cross-Linking Experimenten (nach Klockenbusch und Kast, 2010).

3.4.4 *In vivo* Cross-Linking

Formaldehyd ist membranpermeabel, sodass cytoplasmatische Proteine in der Zelle in ihrem transienten Interaktionsstatus stabilisiert und eingefangen werden können (Abbildung 3.2). Nach 20 Minuten Inkubation mit 0,6% (v/v) Formaldehyd wurden die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation pelletiert und aufgereinigt, wie unter „3.4.1 Präparation der Proteine NreA, NreA[NO₃] und aerobem NreB“ beschrieben wurde. Im Anschluss wurden die ersten vier gesammelten Fraktionen à 1,5 ml vereinigt und per Zentrifugation (5000 rpm, 30 - 60 min, 4 °C, Beckman J2MC; JA14 Rotor) auf ein Volumen von 0,5 ml eingengt (vivaspin 6, Amiconsäulen, Satorius stedim biotech).

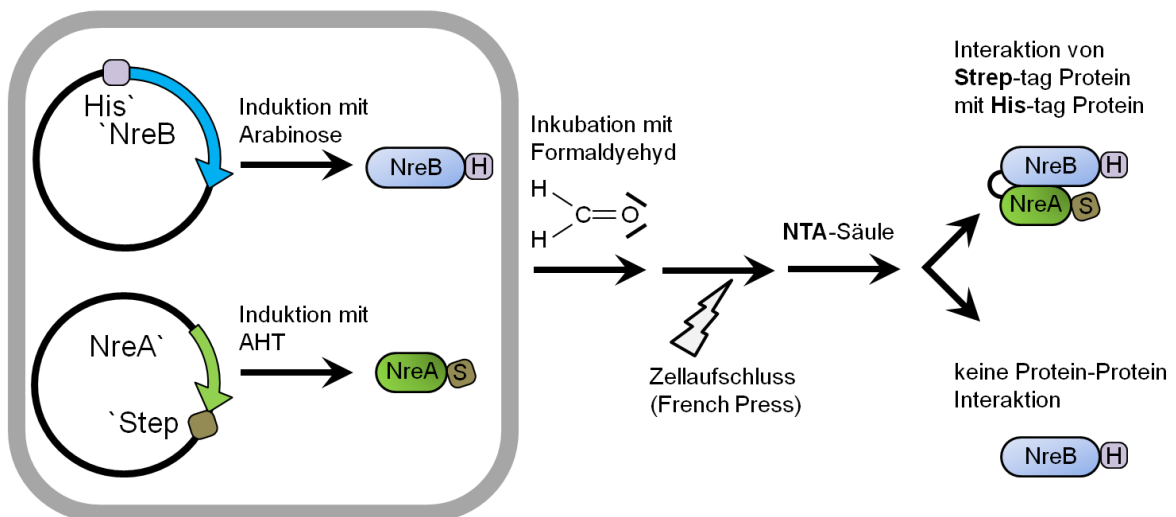


Abbildung 3.2: Schematisches Beispiel der *in vivo* Protein-Protein-Interaktionsstudie mit der His-Protein Interaktions Experiment (HPINE)-Methode von His-NreB mit NreA-Strep. Mit der HPINE-Methode kann nachgewiesen werden, ob zwei Proteine *in vivo* miteinander interagieren, indem sie nach Co-Transformation der codierenden Plasmide überexprimiert werden. Bei einer Interaktion werden die Proteine durch den Membran-permeablen Formaldehyd chemisch verknüpft. Nach einem Zellaufschluss mit der French Press und Aufreinigung des His-tag tragenden Proteins mit einer Ni-NTA Säule, wird der Interaktionspartner, hier mit Strep-tag kloniert, ebenfalls aufgereinigt. Zur Qualifizierung dient ein Immunoblot.

Nach Zugabe von 2x SDS-Ladepuffer wurden die Proben 5 Minuten bei 99 °C aufgeköcht, um Cross-Link-Bindungen wieder zu lösen. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE erfolgte die Analyse durch Western Blot und Immunreaktion mit Anti-NreA- und Anti-NreB-Serum. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die HPINE-Methode (His-Protein Interaktions-Experiment, Graf *et al.*, 2013).

3.4.5 Gelfiltrationsexperimente

Gelöste Moleküle können mit dem Prinzip der Gelfiltration nach ihrer Größe, beziehungsweise ihres Molekülradius über eine Trennsäule aufgetrennt werden. Für diese chromatographische Methode verwendet man ein quervernetztes, granuläres, poröses Polymerharz. Große Moleküle eluieren schneller als kleine Moleküle, da nur die kleinen und nicht die großen Moleküle in die Poren der stationären Phase eindringen und daher länger von der stationären Phase zurückgehalten werden. Als stationäre Phase wurde die Superdex75 (GE Healthcare Life Sciences) mit einer vernetzten Agarose-Dextranstruktur als Säulenmaterial verwendet. Als mobile Phase diente der Laufpuffer E, der auf den Elutionspuffer (Puffer C) der Proteinreinigung angepasst wurde. Es wurde ein Probenvolumen von 200 µl auf die Säule gegeben.

Alle Lösungen wurden mit doppeltdestilliertem Wasser (Milli-Q_{Plus} 185, Millipore) angesetzt, filtriert und entgast.

Laufpuffer E	
Natriumphosphatpuffer pH 7,2	50 mM
NaCl	100 mM
Glycerin	5% (v/v)
NaNO ₃ (optional)	40 mM

Zur Eichung wurden folgende Proteine verwendet.

Tabelle 3.15: Verwendete Eichproteine für die Gelfiltration.

Eichproteine	Molekulargewicht	verwendete Konzentration
Lysozym (aus Hühnereiweiß, Roth)	14,3 kDa	2 mg/ml
Carboanhydrase (Sigma)	29 kDa	3 mg/ml
Albumin (Roth)	66 kDa	3 mg/ml
NreB	80 kDa	2-2,5 mg/ml

3.4.6 Western Blot durch semi-dry Immunoblotting und Antikörperfärbung

Um die Proteine NreA und NreB bei den einzelnen Versuchsreihen spezifisch nachzuweisen, wurde polyklonales Anti-NreA- und Anti-NreB-Serum verwendet. Nach Auftrennung der Proteine abhängig von ihrer Größe durch SDS-PAGE (200 V konstant, Mini PROTEAN® Biorad-System) wurden sie auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman™GE, Healthcare Life Sciences) übertragen. Für diesen Transfer wurde der Aufbau in Abbildung 3.3A verwendet. Dafür wurden sowohl die Whatman®-Filterpapiere als auch die Nitrocellulosemembran mit Transferpuffer durchfeuchtet. Da die Proteine durch die Ummantelung mit SDS-Molekülen negative Ladung besitzen, wandern sie Richtung Kathode. So werden sie bei angelegter Spannung auf die dazwischen platzierte Nitrocellulosemembran transferiert. Der Westernblot (Thermo Scientific Pierce Fast Semi-Dry Blotter) erfolgte 1 Stunde bei Raumtemperatur und konstanter Stromstärke I , die abhängig von der geblotteten Membranfläche wie folgt berechnet wurde:

$$I [mA] = \text{Membranfläche [cm}^2] \times 0,8 \text{ mA/cm}^2$$

Im Anschluss wurde die Nitrocellulosemembran mit roter Färbelösung (3% Trichloressigsäure, 2% Ponceau S) gefärbt, wodurch die transferierten Proteinbanden sichtbar wurden.

Zur Absättigung der gesamten Nitrocellulosemembranfläche mit Proteinen wurde diese über Nacht bei 4 °C (oder 1 Stunde bei RT) mit Blockingpuffer auf dem Kippschüttler (Duomax 1030, Heidolph) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 10 ml Waschpuffer folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, entweder mit Anti-NreA- oder Anti-NreB-Serum (1:2000), für 2 Stunden bei RT (oder 1 Stunde bei RT). Zur Entfernung des primären Antikörpers wurde erneut gewaschen (2-mal mit 10 - 15 ml à 5 - 10 Minuten). Dann wurde mit dem sekundären Antikörper, Anti-Rabbit-HRP (= horseradish peroxidase), für 2 - 2,5 Stunden inkubiert. Der Blot wurde danach erneut gewaschen (2-mal mit 10 - 15 ml à 5 - 10 Minuten), um nicht gebundenen Antikörper vor der Entwicklung zu entfernen. Die Entwicklung erfolgte durch den chromogenen Farbstoff 4-Chloro-1-naphthol oder durch Chemolumineszenz. Beide Entwicklungsmethoden basieren auf durch die HRP katalysierte Reaktionen (Abbildung 3.3B). Bei der Chloronaphthol-Methode betrug die Entwicklungsdauer zwischen 10 – 30 Minuten, wobei der Blot in der Lösung bei RT auf dem Taumelschüttler inkubiert wurde. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurde die Lumineszenz durch Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat (Millipore) erzeugt. Zu gleichen Teilen wurden Luminolreagenz und Peroxidlösung (etwa 200 µl pro Blot) vermengt und auf den Blot geträufelt. Im Folgenden wurde das fluoreszierende Licht auf einen Röntgenfilm (Amersham

Hyperfilm ECL oder Thermo Scientific) übertragen und dieser entwickelt (SRX-101 A, Konica Minolta Medical und Graphical).

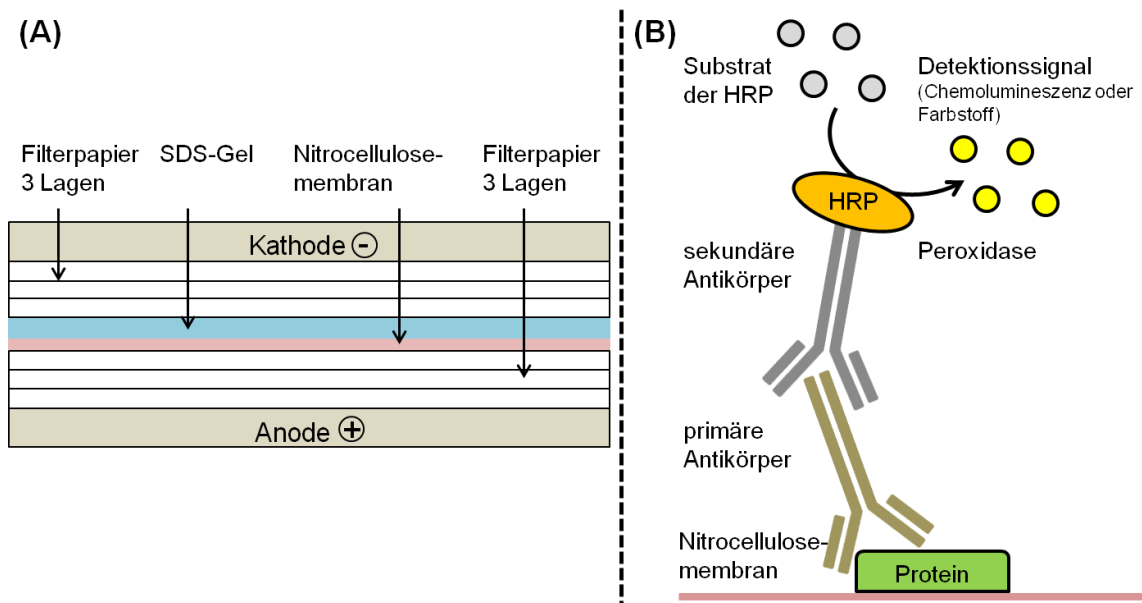


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des Blotters (A) und Illustration der Detektion beim Western Blot (B).

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden folgende Puffer verwendet.

Sammelgel (12%)		Sambrook und Russell (2001)
H ₂ O	1,6 ml	
0,5 M Tris/HCl (Roth) pH 6,8	1,3 ml	
30% Acrylamid (Roth)	2 ml	
10% (w/v) SDS (AppiChem oder Roth)	50 µl	
Tetramethylethylendiamin (TEMED, Fluka)	2 µl	
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS, Fluka)	50 µl	
Trenngel (10%)		Sambrook und Russell (2001)
H ₂ O	4 ml	
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	
30% Acrylamid	3,3 ml	
10% (w/v) SDS	0,1 ml	
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	4 µl	
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0,1 ml	

10x SDS-Laufpuffer		nach Laemmli, 1970
Tris (ICN)	250 mM	
Glycin (AppliChem)	1,92 M	
SDS (Roth)	1% (w/v)	

2x SDS-Probenpuffer	
Tris/HCl pH 6,8	100 mM
SDS	4% (w/v)
Bromphenolblau (Janssen Chimica)	0,2%
Glycerin (Roth)	20%
Dithiothreitol (DTT, Sigma) (frisch add.)	200 mM

SDS-Gel Färbelösung	
Eisessig (Riedel de Haen)	10% (v/v)
Methanol (Roth)	5% (v/v)
Coomassie brilliant blue (Serva)	2 g/l

SDS-Gel Entfärbelösung	
Eisessig (Riedel de Haen)	10% (v/v)
Methanol (Roth)	5% (v/v)

Folgende Puffer und Lösungen wurden für das semi-dry Western Blots benötigt.

Transferpuffer		Towbin <i>et al.</i> , 1979
Tris (ICN)	25 mM	
Glycin (Roth)	192 mM	
Methanol (Roth)	20% (v/v)	

10x PBS pH 7,5	
NaCl (Roth)	1,37 M
KCl (ROTH)	27 mM
Na ₂ HPO ₄ (Roth)	0,1 M
KH ₂ PO ₄ (Roth)	20 mM

Waschpuffer	
PBS	1 x
Tween-20 (Roth)	0,1% (w/v)

Blockingpuffer	
PBS	1 x
Milchpulver (Roth)	5% (v/v)
Tween-20 (Roth)	0,1% (w/v)

Anti-Serum-Lösung	
PBS	1 x
Milchpulver (Roth)	3% (v/v)
Anti-Serum:	
Anti-NreA-, Anti-NreB-Serum	1:2.000
(2. Blut aus dem Kaninchen, polyklonal)	1:2000-1:8.000
Anti-Rabbit-HRP	
(aus der Ziege, igG - ganze Molekül, gekoppelt an alkalische Phosphatase; Sigma)	

Lösungen zum Entwickeln der Western Blots	
<u>Chemolumineszenzentwicklung mit</u>	
Luminolreagenz	etwa 200 µl pro Blot
Peroxidlösung	
Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)	
<u>Chloronaphtollösung</u>	
4-Chloro-1-naphtol (Sigma)	300g/l
in 200 ml/l Ethanol (Roth) lösen	
Tris/HCl pH 7,7	80 mM
H ₂ O ₂ (30%, Fluka)	500µl/l

3.4.7 Bestimmung der Lipaseaktivität für *narG-lip* Reporterstudien

3.4.7.1 Qualitative Bestimmung der Lipase

Zur qualitativen Kontrolle der Lipaseaktivität von NreA und NreA-Mutanten wurde den BM-Agarplatten (mit Chloramphenicol) das nichtionische Tensid Tween-20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat) zugefügt. Lipase spaltet Tween-20, wobei Dodecansäure (C₁₂H₂₄O₂) entsteht. Dodecansäure bildet farblose Nadeln. Diese Kristallnadeln sind deutlich als wolkig-weißer Trübungshof um die Bakterienkolonie erkennbar.

3.4.7.2 Quantitative Bestimmung der Lipase

Für die Analysen von NreA und NreA-Mutanten wurde die Reporterfusion *narG-lip* verwendet. Diese besteht aus einer Fusion des Promotors der Nitratreduktase mit dem Lipasegen *lip*. Verwendet wurden pMW1040 und Derivate (bzw. pMW1041-Derivate für NreA(F28A), NreA(W45A), NreA(R55A) und NreA(R126A)).

Da die exprimierte Lipase ins Medium sekretiert wird, kann die Lipaseaktivität im zellfreien Überstand bestimmt werden. Ein Zellaufschluss muss nicht durchgeführt werden. Der verwendete Lipasetestpuffer wurde vor Reaktionsstart mit Substrat (5 mM *p*-Nitrophenylcaprylat, Sigma) durch Vortexen (Vortex Genie2, Scientific) emulgiert. Durch die Lipase-katalysierte Esterspaltung des Substrates entsteht *p*-Nitrophenolat. *p*-Nitrophenolat ist im basischen Milieu gelb gefärbt und somit photometrisch quantifizierbar (Abbildung 3.4). Der Nachweis wurde in 96-well Platten (PS, F-bottom, Greiner bio-one) durchgeführt, indem 225 µl Puffer mit 25 µl Kulturüberstand zusammengegeben wurden. Anschließend wurde die Extinktionszunahme (m) bei 415 nm über einen Zeitraum von 20 Minuten im Mikrotiterphotometer (EL808, Gen5-Software) detektiert. Zur Auswertung diente der ermittelte, spezifische molare Extinktionskoeffizienten ϵ von $15,188 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (bestimmt mit 4-Nitrophenol, Merck). Es wurde die spezifische Lipaseaktivität (sLA) (U/g dw) ermittelt. Die spezifische Lipaseaktivität ist der Quotient aus der Lipaseaktivität [U] (Menge Lipase, die 1 µmol Substrat in einer Minute umsetzt) und dem Zelltrockengewicht (dw). Das Zelltrockengewicht wird aus der OD_{578} kalkuliert (1 ml Zellsuspension mit einer OD_{578} von 1 entspricht einer Zelltrockenmasse von 0,254 mg). Die spezifische Lipaseaktivität [U/g dw] ist demnach das Maß der Reportergenaktivität und wurde wie folgt berechnet:

$$\text{spez. Lipaseaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg dw}} \right] = 3,3 \times \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \times \text{g} \right]^x \frac{m \left[\frac{E_{415}}{\text{min}} \right]}{OD_{570}}$$

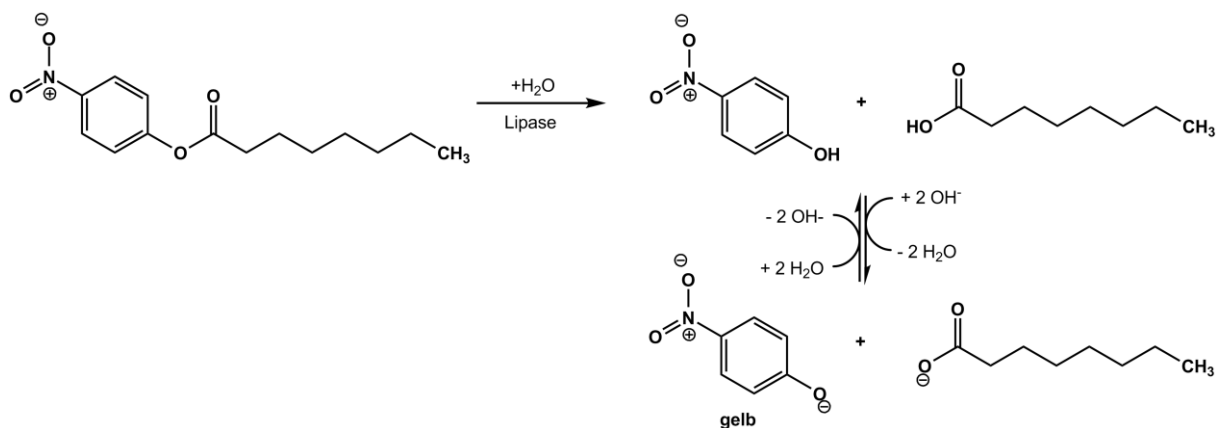


Abbildung 3.4: Reaktionsschema der Lipasekatalyse. Lipase katalysiert die Esterspaltung des Substrates *p*-Nitrophenylcaprylat zu Capronsäure und *p*-Nitrophenol. Unter basischen Bedingungen liegt *p*-Nitrophenol deprotoniert und gelb gefärbt vor. *p*-Nitrophenol ist bei einer Wellenlänge von 415 nm photometrisch quantifizierbar.

Lipasetestpuffer		Rosenstein <i>et al.</i> , 1992
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (Roth)	10 mM	
Triton X-100 (Roth)	0,1% (v/v)	
Tris/HCl pH 9	20 mM	

3.4.8 Das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System

Für die Messungen von Protein-Protein-Interaktionen wurde das Bacterial Two-Hybrid System verwendet (Karimova *et al.*, 1998). Das Prinzip basiert auf der Refunktionalisierung der katalytischen Domäne der Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis* aus den beiden Fragmenten T25 und T18. Ursprünglich werden beide Fragmente T25 und T18 als zusammenhängende Sequenz exprimiert und katalysieren die Umsetzung von ATP zu cAMP. Bei einer genetischen Trennung der Gene von T25 und T18 werden zwei separate Polypeptid-Domänen gebildet, die keine katalytische Aktivität mehr aufweisen (Abbildung 3.5). Die katalytische Aktivität der Adenylatzyklase kann wieder hergestellt werden, indem T25 und T18 durch externes Einwirken zusammengebracht werden. Dies kann erreicht werden, indem an T25 ein Protein I und an T18 ein Protein II fusioniert werden. Sofern Protein I mit Protein II interagiert, können sich T25 und T18 aufgrund der räumlichen Nähe zur aktiven Adenylatzyklase refunktionalisieren. Interagiert Protein I nicht mit Protein II, bleiben T25 und T18 getrennt und inaktiv (nicht gezeigt). Im Folgenden reguliert die Menge an gebildetem cAMP die Menge an exprimierter β -Galaktosidase. Die β -Galaktosidase ist über β -Galaktosidasemessungen quantifizierbar, kann in Miller Units angegeben werden und ist letztlich das Maß der Protein-Protein-Interaktion.

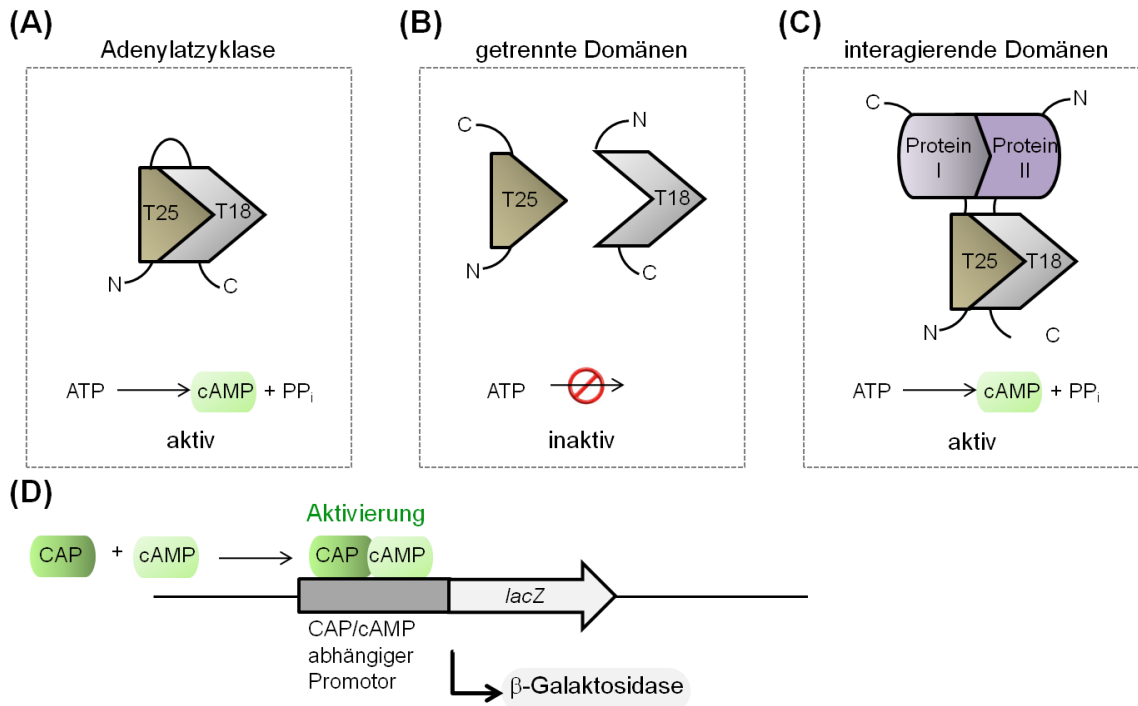


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des BACTH-Systems nach Karimova et al., 1998. Die aktive Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis* bildet aus ATP cAMP und setzt sich aus den Fragmenten T25 und T18 zusammen (A). Die genetische Trennung von T25 und T18 führt zum Verlust der katalytischen Funktionalität (B). Durch Proteinfusionierung von T25 an Protein I und T18 an das mit I interagierende Protein II, kann die Adenylatzyklase refunktionalisiert werden (C). cAMP bindet mit CAP (catabolic activator protein) an spezifische Promotoren. Dadurch wird β -Galaktosidase exprimiert (D)

Für die Konstruktion solcher Hybridproteine aus Protein I oder II mit T25 oder T18 stehen vier Ausgangsvektoren zur Verfügung. Dabei besitzen das Vektorenpaar pKT25 und pKNT25 neben der für T25 codierenden Sequenz eine Kanamycinresistenz (Kan^R) und den Replikationsursprung *pori15*. Das Vektorenpaar pUT18C und pUT18 codiert für die Sequenz von T18 und unterscheidet sich in der Resistenzkassette (Ampicillinresistenz, Amp^R) und dem Replikationsursprung *ColE1 ori* von pKT25/pKNT25. Die Vektoren pKT25 und pUT18C besitzen die Multiple Cloning Site (MCS) vor dem 5'-Ende der codierenden Sequenz für T25 beziehungsweise T18, sodass die Fragmente an den N-Terminus des einklonierten Proteins fusioniert vorliegen. Den umgekehrten Fall erhält man bei Verwendung der Vektoren pKNT25 und pUT18. Dort liegt die MCS am 3'-Ende der codierenden Sequenz für T25 beziehungsweise T18, sodass T25 bzw. T18 C-terminal an das einklonierte Zielprotein geknüpft werden (Abbildung 3.6). Die schematische Darstellung aller konstruierten, möglichen Fusionsproteine ist in Abbildung 3.7 gezeigt.

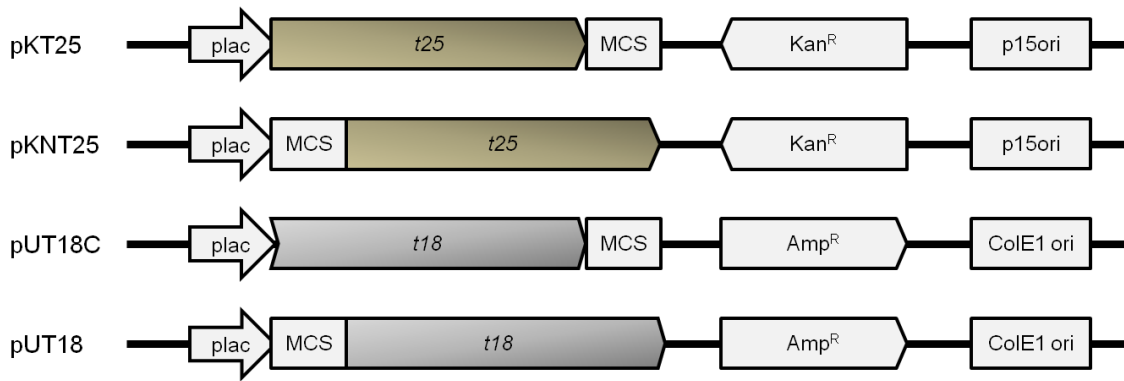


Abbildung 3.6: Ursprungsvektoren des Bacterial Two-Hybrid System (BACTH) in schematischer Darstellung. Das Vektorpaar pKT25 und pKNT25 kodiert für die T25-Domäne (*t25*, ocker), das Vektorpaar pUT18C und pUT18 für die T18-Domäne (*t18*, dunkelgrau). Zusätzlich ist dargestellt, ob die Multiple Cloning Site (MCS) vor oder hinter *t25* und *t18* liegt. Die Resistenzkassetten (Kan^R; Amp^R) und die Replikationsursprünge (p15ori; ColE1 ori) der einzelnen Vektoren sind gezeigt. Die Expression des in die MCS klonierten Gens unterliegt der Kontrolle des *plac*-Promotors. Der *plac*-Promotor ist IPTG-induzierbar. Bei Einfügung einer Gensequenz in die MCS ergibt sich bei pKT25 und pUT18C ein N-terminales, bei pKNT25 und pUT18 ein C-terminales Fusionsprotein.

Für die Interaktionsmessungen ist es nötig den *cya*(Adenylatzyklase)-negativen Stamm BTH101 zu verwenden und für zuverlässige Ergebnisse die anschließend erhaltenen Bakterienkolonien nicht länger als eine Woche zu verwenden. Zum Einbringen der Fusionsplasmide wurden je 15 ng Plasmid-DNA in elektrokompente BTH101 Zellen co-transformiert und mittels KAXI-Platten selektioniert. Als Positivkontrolle für eine Refunktionalisierung der Adenylatzyklase wurden die Plasmide pT25-zip und pUT18C-zip verwendet. Diese verfügen über je ein Fragment der stark miteinander interagierenden Leucizipperdomänen des Transkriptionsfaktors GCN4 aus Hefen, je einmal fusioniert mit T25 bzw. T18.

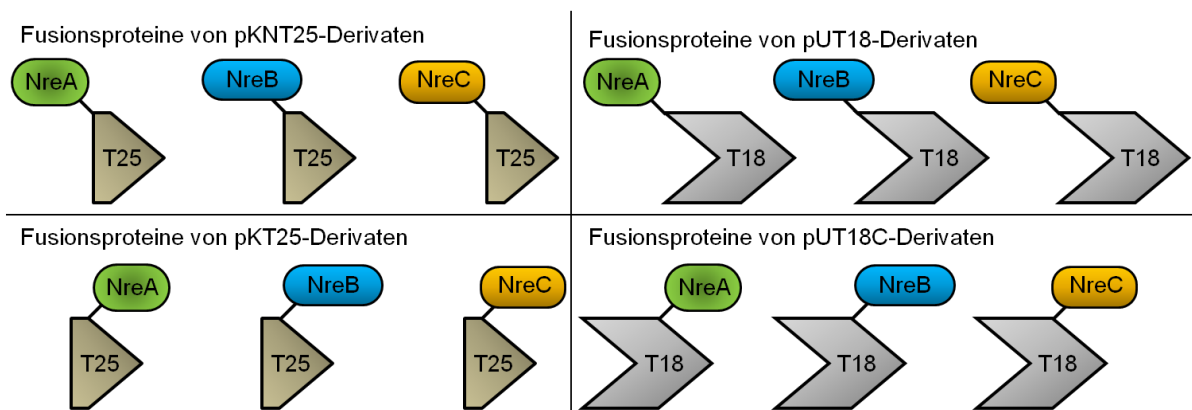


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der konstruierten Fusionsproteine des Bacterial Two-Hybrid System (BACTH). Gezeigt sind alle möglichen Kombinationen NreA, NreB und NreC mit T18 und T25 zu fusionieren, nachdem *nreA*, *nreB* und *nreC* in die MCS aller vier Ursprungsvektoren (Abbildung XX) kloniert wurden.

3.4.9 Bestimmung der β -Galaktosidase

3.4.9.1 Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase

Zur qualitativen Kontrolle von Nre-Interaktion im BACTH-System wurde KAXI-Platten (LB-Agar mit Ampicillin, Kanamycin und IPTG) das chromogene Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) zugefügt. β -Galaktosidase hydrolysiert X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl (Abbildung 3.8). Letzteres wird durch Sauerstoff in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo umgewandelt. Blau gefärbte Kolonien weisen auf Interaktion hin.

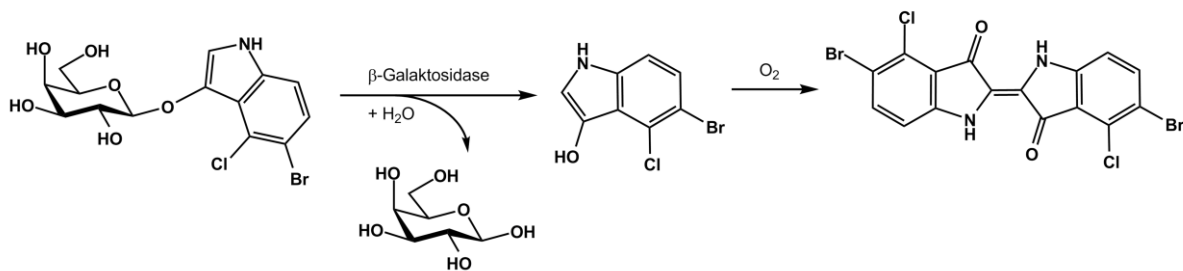


Abbildung 3.8: Qualitativer β -Galaktosidasenachweis. 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) wird durch β -Galaktosidase zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Der blaue Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo entsteht durch oxidative Dimerisierung.

3.4.9.2 Durchführung und quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase

Bei der Verwendung von *deep well*-Platten für den Zellaufschluss wurde wie folgt vorgegangen. Nach Bestimmung der Zelldichte OD_{570} in 96-well Platten, wurden 100 μ l Zellkultur in *deep well*-Platten mit 900 μ l vorgelegtem β -Galaktosidasepuffer pipettiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch 30-maliges Hoch- und Runterziehen von 800 μ l des Gemisches in eine 1200 μ l-Pipettenspitze (RAININ Multidispersionspipette, E4 XLS 100 - 1200 μ l LTS). Im Anschluss wurden Chloroform und Zellfragmente per Gravitation abgetrennt (15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur). Der Überstand wurde in Vierfachbestimmung auf β -Galaktosidaseaktivität überprüft. Für die Quantifizierung wurden 170 μ l Überstand in eine 96-well-Platte (PS, F-bottom, Greiner bio-one) pipettiert, 10 Minuten bei 30 °C inkubiert und mit 30 μ l Substrat *ortho*-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG) vermengt. Durch Zugabe von 50 μ l $NaCO_3$ wurde die Reaktion nach 20 Minuten gestoppt und die Extinktion bei 415 nm im Mikrotiterphotometer (EL808, Gen5-Software) gemessen. Der quantitative Nachweis für die Nre-Interaktion im BACTH-System erfolgte folglich mit dem chromogenen Substrat ONPG. β -Galaktosidase hydrolysiert ONPG in Galaktose und *ortho*-Nitrophenol (Abbildung 3.9).



Abbildung 3.9: Quantitativer β -Galaktosidasenachweis. β -Galaktosidase hydrolysiert *o*-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG) zu Galaktose und *o*-Nitrophenol. *o*-Nitrophenol ist bei einer Wellenlänge von 415 nm quantifizierbar.

Letzteres wurde nach Bestimmung der Extinktion bei 415 nm zur Berechnung der β -Galaktosidaseaktivität in Miller Units [MU] verwendet (Miller, 1972). Miller Units [MU] sind demnach das Maß der Reporterogenaktivität und wurden wie folgt berechnet:

$$\beta - \text{Galaktoseaktivität in Miller Units [MU]} = \frac{1000 \times \Delta E_{415}}{t [\text{min}] \times V [\text{ml}] \times \Delta E_{570}}$$

Hierbei wurde konstant gewählt: $t = 20 \text{ min}$ und $V = 100 \mu\text{l}$.

Durch Vergleich der Höhe der Miller Units mit der Negativkontrolle (garantiert nicht interagierende Proteine, Zip und NreA) konnten letztlich Rückschlüsse auf Protein-Protein-Interaktionen gezogen werden.

β -Gal-Puffer pH7	
Kaliumphosphat-Puffer aus K_2HPO_4 (Roth) und KH_2PO_4 (Roth)	100 mM
KCl (Roth)	10 mM
MgCl_2 (Roth)	1 mM
β -Mercaptoethanol (Roth)	2,7 ml/l
900 μl /well	
Komponenten für den β -Galaktosidase Test	
ONPG (<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid, Roth)	4 mg/ml, 30 μl /well
Na_2CO_3 (Fluka)	1M, 50 μl /well
CHCl_3 (Chloroform, Roth)	20 μl /well
0,1% SDS-Lösung (Roth)	40 μl /well

3.5 Genetische Methoden

Molekulargenetische Standardmethoden, wie Polymerasekettenreaktion (PCR), Restriktion und Ligation von DNA wurden basierend auf Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Die benötigten Oligonukleotide für die PCR und komplementäre Mutageneseprimer wurden von Eurofins MWG (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich erstellt. Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas, Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot) bezogen. Die Isolierungen und Reinigung von PCR-Produkten und Ligationsansätzen erfolgten mit PCR Purification Kits von Qiagen (Hilden, QIAquick), Stratagene (USA) oder Sigma-Aldrich. Die Isolierungen und Reinigung von Plasmiden wurde mit Plasmid-Mini-Kits von Qiagen (Hilden), Stratagene (USA) oder Sigma-Aldrich durchgeführt. Vektor-DNA wurde mit einer alkalischen Phosphatase (SAP, Fermentas) dephosphoryliert. Ligationen mit einer T4-Ligase (Thermo Scientific) wurden bei 16 °C über Nacht und meist im molekularen Vektor zu Insert Verhältnis von 1:5 oder 1:10 durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden ohne Fällungsschritt weiter verwendet. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte in Mikroliterküvetten im Biophotometer (Eppendorf). Die gerichtete Mutagenese wurde in Anlehnung an das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (USA) mit den Polymerasen *Pfu* (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) *Pfu*Ultrall (Stratagene, USA) oder *Phusion* (Finnzymes) und der Endonuclease *DpnI* (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Es wurden selbst hergestellte hitzekompetente XL1-Blue Zellen verwendet. Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen (JM109, BTH101) fand nach Farinha *et al.* (1990) statt. Die Herstellung elektrokompetenter *S. carnosus* Zellen (m1, Δ nr*eA*) fand nach Löfblom *et al.* (2006) statt. Zur Einbringung von Plasmiden in *E. coli* Zellen wurde Elektroporation (Dower *et al.*, 1988, Elektroporationsgerät EasyjetcT Prima EQUIBIO, oder Eppendorf) oder Hitzeschock (Froger & Hall, 2007) angewendet. Eine Co-Transformation von mehr als einem Plasmid (mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen und Resistenzen; Novick, 1987) wurde auch mittels Elektroporation durchgeführt. Alle molekulargenetisch erstellten Plasmidkonstrukte wurden durch Sequenzierung bestätigt, indem sie mittels designer Sequenzierungsprimer von den Firmen Genterprise (Mainz) und Agowa LGC (Berlin) überprüft wurden.

3.5.1 Herstellung hitzeschockkompetenter Zellen und Durchführung des Hitzeschocks

Zur Herstellung von hitzekompetenten Zellen wurde nach aerober Zucht in LB-Medium zum Beginn der log-Phase (OD_{578} 0,5 - 0,6) das Wachstum durch mindestens 10 minütige Inkubation auf Eis gestoppt. Anschließend erfolgte ein Entfernen der Salze durch mindestens zweifaches Waschen mit TSB-Medium (etwa 0,1 ml pro ml Zucht) und erneute 10 Minuten Inkubation auf Eis. Abschließend wurden die Zellen in TSB-Medium resuspendiert (10 μ l pro ml Zucht) und umgehend bei -80 °C eingefroren und gelagert. Für die anschließende

Hitzeschocktransformation wurden Aliquots à 50 µl benötigt. Dieser erfolgt analog dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit. 1,5 µl *DpnI*-verdautes Mutagenese-PCR-Produkt wurde zu den hitzekompetenten Zellen gegeben, 30 Minuten auf Eis gehalten, bei 42 °C für 45 Sekunden erhitzt und abschließend 2 Minuten auf Eis gekühlt. Dann wurden die Zellen 1,5 bis 2 Stunden in 1 ml SOC-Medium bei 37 °C geschüttelt und auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert.

TSB-Medium		Sambrook und Russell (2001)
Polyethylenglycol (PEG 6000)	10% (w/v)	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Roth)	10 mM	
MgCl ₂ (Fluka)	10 mM	

Glycerin-MOPS		Sambrook und Russell (2001)
MOPS (Roth)	1 mM	
Glycerin (Roth)	15% (v/v)	

3.5.2 Elektroporation bei *S. carnosus* und Herstellung elektrokompetenter *S. carnosus* Zellen

Zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurde nach aerober Zucht in 500 ml BM-Medium bis zur OD₅₇₈ von 0,6 - 0,7 das Wachstum durch 15 minütige Inkubation auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in dreimal mit eiskaltem Wasser und dann dreimal mit eiskaltem 10%igen Glycerin (v/v) gewaschen (je 30 ml, 15 ml, 8 ml). Anschließend wurden sie in 1 ml Elektroporationspuffer aufgenommen und à 60 µl aliquotiert. Vor der Verwendung wurden sie mindestens 24 Stunden bei -80 °C gelagert.

Zur Durchführung der Elektroporation wurden die Zellen etwa 5 Minuten auf Eis aufgetaut und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde DNA (mindestens 5 µg) addiert und 10 Minuten später „elektroporiert“. Dann wurden die Zellen 2 Stunden in 1 ml BM-Medium bei 37 °C geschüttelt und auf Antibiotika-haltigen Agarplatten für etwa 50 Stunden inkubiert.

Elektroporationspuffer		nach Löfblom <i>et al.</i> , 2006
D-Saccharose (Roth)	0,5 mM	
Glycerin (Roth)	10% (v/v)	

3.5.3 Plasmidisolierung aus *S. carnosus*

S. carnosus besitzt als Gram-positiver Organismus eine dicke Mureinschicht. Die Mureinschicht muss besonders aufgebrochen werden, um eine gute Plasmidausbeute zu

erhalten. Hierfür wurde während der Plasmidpräparation ein Zwischenschritt eingefügt. Die in Resuspensionspuffer aufgenommenen Zellen wurden mit Mikrogglaskugeln ($\varnothing = 0,1$ mm) in einem FastPrep-Gerät (FastPrep®-24, Biomedicals) bei 5 m/sek (10 – 20 Sekunden) mechanisch zerstört. Beim späteren Zentrifugationsschritt während des Standardprotokolls wurden die Mikrogglaskugeln entfernt, bevor die DNA-Bindesäule beladen wurde.

3.5.4 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Amplifikation von DNA

Die Polymerase-Ketten-Reaktion, welche DNA durch ihre zyklische Abfolge von Denaturierung, Annealing und Elongation vervielfältigt, wurde zur Amplifikation gewünschter Gene (Mullis *et al.*, 1986) und für Mutagenesestudien verwendet. Die PCR wurde im iCycler (Biorad) oder MyCycler (Bioead) durchgeführt.

	<i>PfuUltra</i>	Phusion
PCR-Puffer inkl. MgCl ₂	5 μ l <i>PfuUltra</i> -Puffer	10 μ l HF-Puffer
Dimethylsulfoxid (1M)	-	1 μ l
forward/reverse Primer	je Primer 0,5 μ M	je Primer 0,5 μ M
dNTP Mix (10 mM)	je 250 μ M	je 250 μ M
Template DNA	50-200 ng	10-200 ng
Polymerase	1 U	1 U
dest. H ₂ O	auf 50 μ l auffüllen	auf 50 μ l auffüllen

	<i>PfuUltra</i>	Phusion
1. Initiale Denaturierung	95 °C / 2 min	98 °C / 30 sek
2. Denaturierung	95 °C / 30 sek	98 °C / 10 sek
3. Annealing	T _M - 5°C / 30 sek	T _M + 3°C / 20 sek
4. Elongation	72 °C / 1 min/kb	72 °C, 15 - 30 sek/kb
5. Finale Elongation	72 °C / 10 min	72 °C, 7 min

25 - 35 Zyklen

der Schritte 2. bis 4.

Abhängig von den verwendeten Polymerasen, den Nukleotidlängen, der gewünschten Amplifikate und den spezifischen Primerschmelzpunkten wurden die PCR-Protokolle in den einzelnen Versuchen angepasst. Als Richtwert für die Annealingtemperatur wurde immer von den Primerschmelzpunkten der Hersteller ausgegangen.

3.5.5 Gerichtete Mutagenese mittels PCR

Der Austausch spezifischer Aminosäurereste innerhalb eines Proteins ist durch gerichtete Mutagenese möglich. Basierend auf dem Protokoll von QuikChange Site-Directed-Mutagenesis Kit (Stratagene) kann der gewünschte Austausch auf Genebene unter Verwendung von spezifischen Primern erreicht werden. Dabei wird der gesamte Vektor inklusive des inklonierten Gens amplifiziert. Das verwendete Primerpaar ist zueinander revers komplementär und fast komplementär zur Gensequenz des Zielproteins. Lediglich das Codon des gewünschten zu mutierenden Aminosäurerestes wird variiert. Zur Isolierung des PCR-Produktes mit der variierten Gensequenz wird mittels der Restriktionsendonuklease *DpnI* das methylierte Elternplasmid abgebaut. Der Ansatz wird anschließend in XL1-Blue *E. coli* Zellen transformiert und entsprechend selektiert. Die Mutagenesen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in das Plasmid pMW1040 eingefügt. Zur Sequenzierung wurde der erstellte spezifische Sequenzierungsprimer Sequ_nreA verwendet, welcher 61 bp vor dem Transkriptionsstart von *nreA* bindet.

Aufgrund der Größe von 11 kb von pMW1040 wurde überwiegend die *Pfu*Ultrall verwendet, welche sehr schnell ist und zudem zuverlässige Ergebnisse lieferte.

	<i>Pfu</i> Ultrall
PCR-Puffer inkl. MgCl ₂	5 µl <i>Pfu</i> Ultrall-Puffer
forward/reverse Primer	je 125 ng
dNTP Mix (10 mM)	je 250 µM
Template DNA	50 ng
Polymerase	1 – 2,5 U
dest. H ₂ O	auf 50µl auffüllen

	<i>Pfu</i> Ultrall > 10kb	Phusion
1. Initiale Denaturierung	92 °C / 2 min	98 °C / 30 sek
2. Denaturierung	92 °C / 10 sek	98 °C / 10 sek
3. Annealing	T _M - 5°C / 20 sek	T _M + 3 °C / 20 sek
4. Elongation	68 °C / 30 sek/kb	72 °C, 15 – 30 sec/kb
Zyklen 2.-4.		
20–25 Wiederholungen		

Der gesamte PCR-Ansatz wurde im Anschluss für den anschließenden *DpnI*-Verdau verwendet.

3.5.6 Kontrolle von PCR-Produkten und Plasmiden

Zur Kontrolle auf eine erfolgreiche PCR wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Diese trennen die DNA-Fragmente nach ihrer Größe auf, welche mittels eines Standards (1kb-ladder, Fermentas) verglichen werden konnten. Analog wurden Plasmide auf eine erfolgreiche Klonierung überprüft, wobei hier eine Restriktion zum Wiederausschneiden des Inserts voranging.

3.5.7 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer pH 8	
Tris (Roth)	242 g/l
Essigsäure (Roth)	0,571% (v/v)
Na ₂ -EDTA (Roth)	50 mM
1%-Agarosegele	
Agarose (Roth)	10 g/l
Ethidiumbromid (Roth)	25 µl/l
lösen in 1x TAE-Puffer und in der Mikrowelle (900, Alaska) aufkochen	

3.5.7 Konstruktion von Plasmiden

3.5.7.1 Konstruktion des Vektors pMW1782

Um zu messen, unter welchen Bedingungen und zu welchen Zeitpunkten der Wachstumsstadien von *Staphylococcus carnosus* das *nreABC*-Operon exprimiert wird, wurde in Anlehnung an die *narG-lip* Fusion von pMW1001 ein Reporter-genplasmid mit einer *nreA-lip* Fusion konstruiert. Von dem Plasmid pPS44 (Peschel *et al.*, 1993) wurde das Lipasegen (*lip*) aus *Staphylococcus hyicus* amplifiziert um es in den Zielvektor pMW418 zu klonieren. Mit den Primern Lip_*Xho*_for und Lip_*Bgl*_rev wurden während der PCR die Schnittstellen *Xho*I und *Bgl*II eingefügt um eine gerichtete Klonierung des *lip*-Gens zu gewährleisten. In den Vektor pMW418 wurden die Restriktionsschnittstellen durch zielgerichtete Mutagenese eingefügt. Die *Xho*I-Schnittstelle wurde in das *nreA*-Gen und die *Bgl*II-Schnittstelle hinter *nreC* eingefügt. Das Ligationsprodukt pMW1782 besitzt folglich die Reporter-genfusion *nreA-lip*. Zur Gewährleistung des richtigen Abstandes des *lip*-Gens zum nativen Promotor von *nreABC*, wurde das Voll-längen-*lip* in den open reading frame von *nreA* kloniert (Abbildung 3.10). Es wird also eine Proteinfusion NreA'-Lip exprimiert, welche noch die ersten drei Aminosäurereste von NreA trägt. Im pMW1782 steht die Lipaseexpression unter der Kontrolle des *nreABC*-Promotors und kann nach Expression und Sekretion ins

Medium photometrisch quantifiziert werden. Untersuchungen mit pMW1792 wurden im Rahmen der Diplomarbeit von S. Handel durchgeführt (2013).

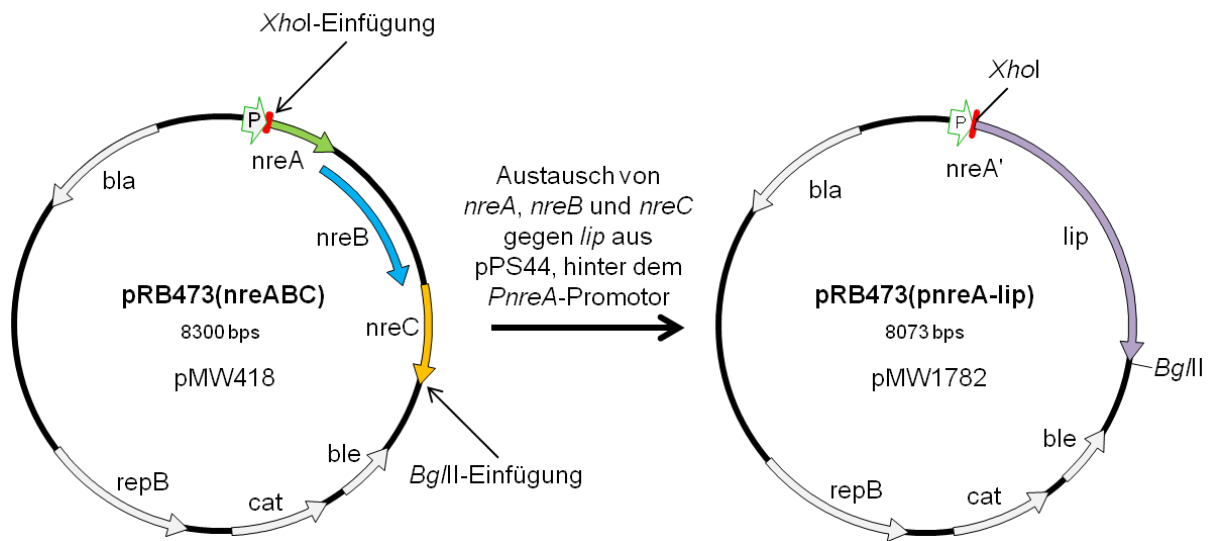


Abbildung 3.10: Konstruktion des Promotortestplasmids pMW1782 durch Fusion aus *nreABC*-Promotor (*PnreA*) und Lipasegen *lip*. In das Ausgangsplasmid pMW418 wurde *XhoI* in *nreA* und *BglII* hinter *nreC* eingefügt. Das Lipasegen *lip* aus *S. hyicus* wurde hinter den Promotor von *nreABC* (*PnreA*) gerichtet kloniert. *lip* wurde in den offenen Leserahmen von *nreA* eingefügt und von *nreA* sind noch 9 Basen vorhanden. pMW1782 ist ein *E. coli* / *S. carnosus* Shuttlevektor und trägt eine Ampicillinresistenz für *E. coli*, sowie eine Chloramphenicolresistenz für *S. carnosus*.

3.7.2 Konstruktion des Vektors pMW1532

Der Vektor pMW1532 ist ein Derivat von pMW1040 und *nreBC*-defizient. Durch Einfügung von zwei *BglII*-Restriktionsschnittstellen im 5'-Bereich von *nreB* (nach 33 Basen) und im 3'-Bereich von *nreC* (9 Basen vom 3'-Ende aus) und anschließender Religation erhält man einen Vektor mit ausschließlich Vollängen-*nreA* (Abbildung 3.11). Aufgrund der Genüberlappung von *nreA* und *nreB* von 23 Basen und verbleibenden 8 Basen von *nreC*, ergibt sich ein kurzer codierter Bereich *nreB'*-*nreC* aus 31 Basen, der analog zum *nreB*-Gen von der Polymerase abgelesen werden kann. pMW1532 wurde in den *S. carnosus* $\Delta nreA$ Stamm transformiert und auf seine Komplementation von *NreA* mittels Lipaseexpressionsmessungen überprüft.

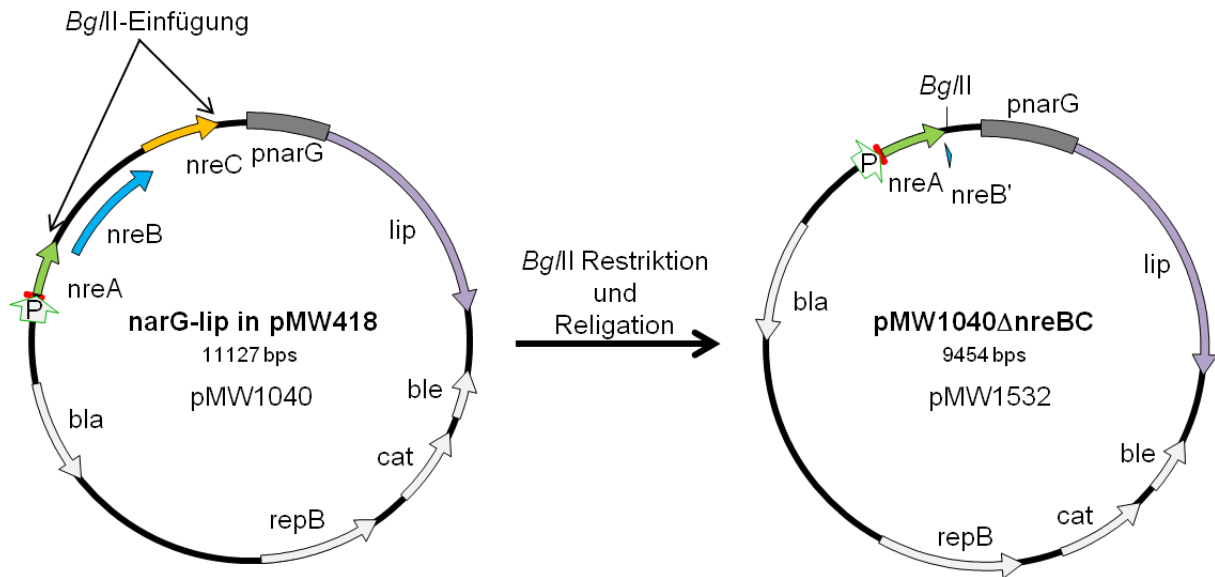


Abbildung 3.11: Konstruktion des Promotortestplasmids pMW1532 mit *nreA* und *narG-lip*. In das Ausgangsplasmid pMW1040 wurde die Schnittstelle *BglII* in *nreB* und *nreC* eingefügt. Der für *nreB* und *nreC* codierende Bereich wurde ausgeschnitten und der Vektor religiert. pMW1532 ist ein *E. coli* / *S. carnosus* Shuttlevektor und trägt eine Ampicillinresistenz für *E. coli*, sowie eine Chloramphenicolresistenz für *S. carnosus*.

3.7.3 Konstruktion des Vektoren pMW1949 und pMW1950

Die Vektoren pMW1949 (pBAD33*nreA*) und pMW1959 (pBAD33*nreB*) sind Derivate des pBAD33-Vektors (Abbildung 3.12) und durch Arabinose induzierbar. Zur Konstruktion von pMW1949 wurde *nreA* inklusive der Ribosomenbindungsstelle und dem His₆-tag aus pQE31*nreA* amplifiziert und durch Einfügung der Restriktionsschnittstellen *PstI* und *HindIII* in pBAD33 kloniert. Analog wurde *nreB* mit der Ribosomenbindungsstelle und dem His₆-tag aus pMW400 (pET28*nreB*) über *XbaI* und *KpnI* in pBAD33 kloniert.

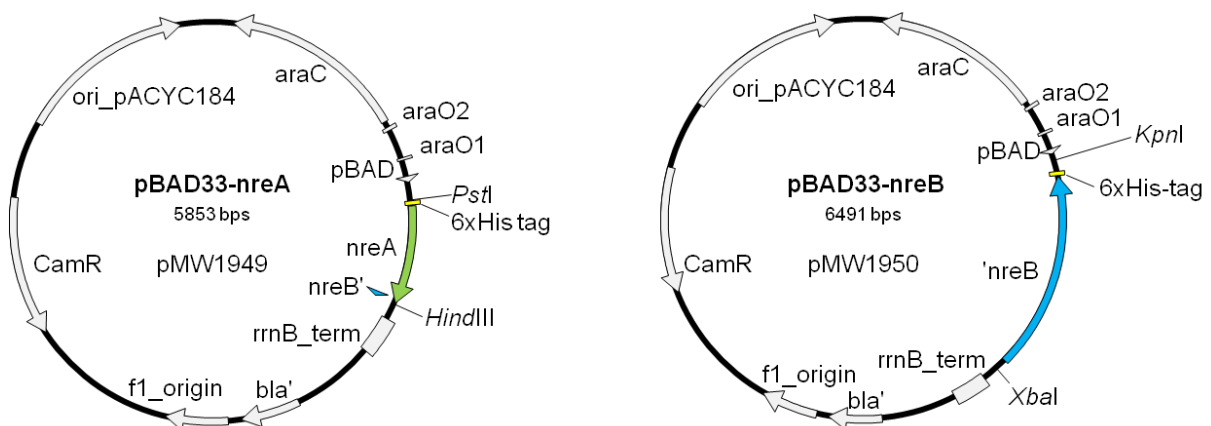


Abbildung 3.12: Konstruierte Überexpressionsplasmide pMW1949 für His-NreA und pMW1950 für NreB-His. In das Ausgangsplasmid pBAD33 wurden die Gene für *nreA* und *nreB* zusammen mit einer Ribosomenbindestelle aus pQE31*nreA* über *PstI* und *HindIII*, beziehungsweise aus pET28*nreB* über *XbaI* und *KpnI*, kloniert. Die Derivate sind durch Arabinose induzierbar.

3.7 Bioinformatische Methoden

Folgende Datenbanken, Programme und Weblinks wurden verwendet:

3.7.1 Datenbanken

Für Literatursuche und Proteininformationen

NCBI, PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/>

RCSB PDB: <http://www.pdb.org>

Uniprot: <http://www.uniprot.org> und <http://us.expasy.org/sprot/>

3.7.2 Alignmentprogramme für Vergleiche von Nukleotidsequenzen und Primärsequenzen

BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BLAST, align two sequences: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

NCBI/BLAST/Blastn: Basic local alignment Search Tool

ClustalW2: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Spidey: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/>

3.7.3 Programm zur Darstellung von Alignments

GeneDoc Verion 2.7.000 (1997)

3.7.4 Vorhersage und Bearbeitung von Sekundär- und Tertiärstrukturen

PSIPED: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

SWISS-MODEL: <http://swissmodel.expasy.org/>

Chimera: <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

3.7.5 Primerdesign mit Kalkulator von Oligonukleotid-Eigenschaften

OligoCalc: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

3.7.6 Virtuelles Clonieren

Clone Manager 5.0, Sci-Ed Software

4. Ergebnisse

Das fakultativ anaerobe Bakterium *Staphylococcus carnosus* ist unter anaeroben Bedingungen in der Lage, Nitrat als Elektronenakzeptor der Atmung zu verwenden. Nitrat wird dafür durch den Transporter NarT in die Zelle importiert und dort in zwei Schritten über Nitrit zu Ammonium umgesetzt (Neubauer und Götz, 1996). Die Energieausbeute der Nitratatmung ist gegenüber der von Gärungsstoffwechsel höher und somit unter anaeroben Bedingungen ein Fitnessfaktor für *S. carnosus*. Die Regulation der Expression der drei am Nitratstoffwechsel beteiligten Komponenten, der Nitratreduktase NarGHI (Pantel *et al.*, 1998), der Nitritreduktase NirRBD (Neubauer *et al.*, 1999) und des Nitrattransporters NarT (Fast *et al.*, 1996), wird durch das cytoplasmatische Zweikomponentensystem NreBC gesteuert (Fedtke *et al.*, 2002; Kamps *et al.*, 2004; Schlag *et al.*, 2008; Schlag, 2008). Unter anaeroben Bedingungen werden die Zielgene deutlich stärker angeschaltet (Pantel *et al.*, 1998), sodass die Proteine exprimiert werden und Nitratatmung stattfinden kann.

Die Gene *nreB* und *nreC* für NreBC befinden sich in genomischer Nachbarschaft zu denen der Nitratatmung und liegen auf einem gemeinsamen Operon, *nreABC* (Fedtke *et al.*, 2002; Kamps *et al.*, 2004; Uden *et al.*, 2013). Daneben befindet sich ein drittes Gen, *nreA*, welches für das Protein NreA codiert, dessen Funktion bislang unbekannt ist (Fedtke *et al.*, 2002). Aufgrund verschiedener Merkmale wurde NreA, ein cytoplasmatisches Protein mit 155 Aminosäuren, bereits von Fedtke *et al.* (2002) als Nitrat/Nitrit-Sensor vermutet. Auch das Fehlen anderer bekannter Nitratsensoren in *S. carnosus* (Rosenstein *et al.*, 2009; Niemann *et al.*, 2013) spricht für diese Annahme. Wie es diese Funktion ausübt und in welcher Weise es mit NreBC zusammen wirkt, ist dabei noch völlig offen.

Um die Funktion von NreA näher zu untersuchen, wurden verschiedene Herangehensweisen gewählt. Zum einen wurde NreA alleine und direkt untersucht, indem gerichtete Mutagenesen durchgeführt und die Auswirkungen der Mutationen in NreA auf die transkriptionelle Regulation der Nitratatmung untersucht wurden. Hierfür wurden *narG-lip*-Reporterstudien durchgeführt (Nilkens *et al.*, 2013) mit dem Ziel, funktionell wichtige Aminosäurereste zu identifizieren und durch deren Variation die Rolle von NreA zu verstehen.

Zum anderen wurde untersucht, in wieweit NreA mit NreBC zusammenwirkt. Hierzu wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels BACTH-Messungen, sowie Cross-Linking-Experimente *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

4.1 Wachstumsverhalten

Um die Bedeutung von NreABC für das Wachstum von *S. carnosus* zu untersuchen, wurden Wachstumsexperimente in definiertem Minimalmedium (K-Medium) durchgeführt. Neben dem *S. carnosus* Wildtypstamm TM300 wurden die chromosomale $\Delta nreABC$ -Mutante m1 und die chromosomale $\Delta nreA$ -Mutante unter verschiedenen Wachstumsbedingungen getestet.

Das K-Medium enthielt alle wichtigen Zusatzstoffe für Energie- und Zellstoffwechsel. Glukose (10 mM) und optional Natriumnitrat (10 mM) dienen als C- und Energiequelle. Man konnte eine deutliche Zellzunahme beobachten.

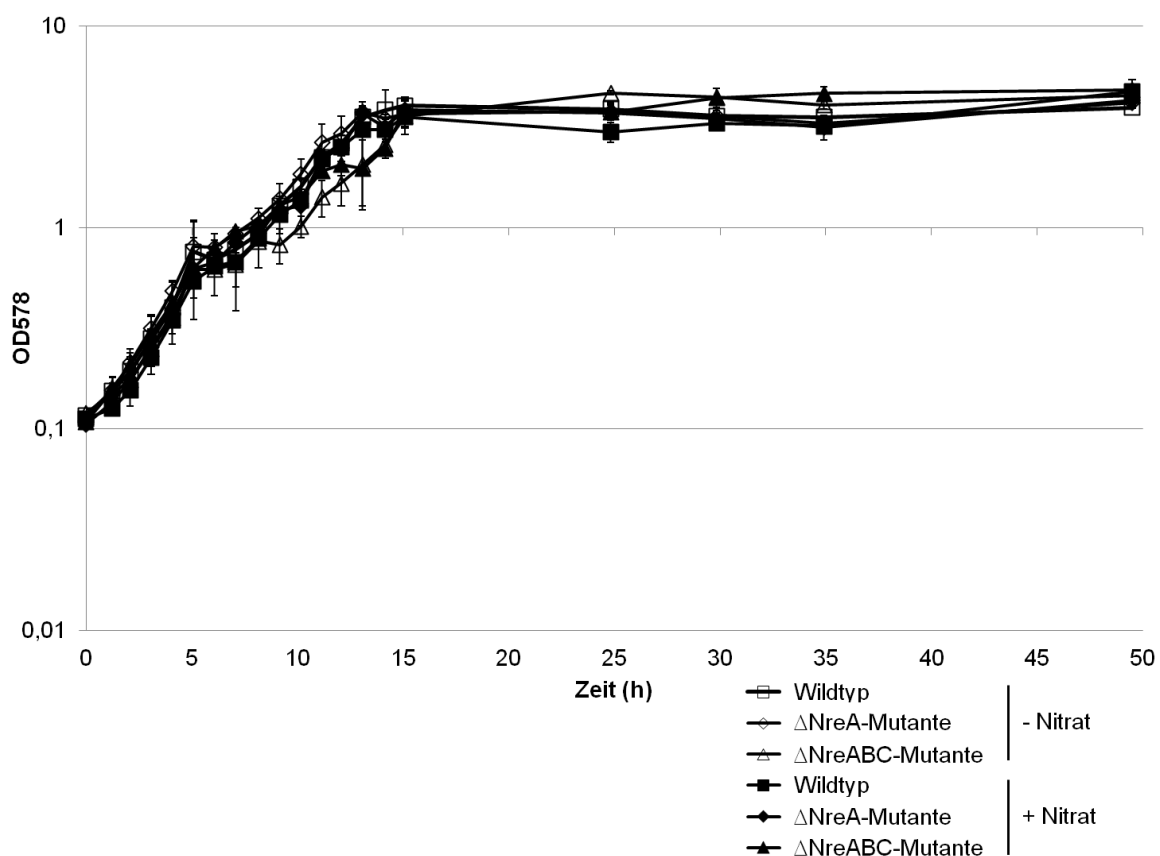


Abbildung 4.1: Aerobes Wachstumsverhalten von *S. carnosus* Wildtyp und Nre Mutanten in definiertem Minimalmedium und optionalem Zusatz von Nitrat. Zucht der $\Delta nreABC$ -Mutante m1, der $\Delta nreA$ -Mutante und des Wildtypstamms TM300 in K-Medium mit Glukose als C-Quelle (10 mM) und optional Natriumnitrat (10 mM).

Es zeigte sich, dass die drei Stämme unter aeroben Verhältnissen keine Wachstumsunterschiede aufweisen (Abbildung 4.1). Ähnliches wurde bereits für die $\Delta nreA$ -Mutante und deren komplementierte Variante ($\Delta nreA p nreA$) im Vollmedium (BM) beobachtet (Schlag, 2008). Da durch die gewählten Versuchsbedingungen gewährleistet war, dass zu jedem Zeitpunkt genügend Sauerstoff zur Verfügung stand, konnte dieser als Elektronenakzeptor fungieren. Die Zugabe von Nitrat zum Medium unter aeroben

Wachstumsbedingungen zeigte keinen signifikanten Effekt. Alle Zuchten erreichten nach etwa 15 Stunden eine OD_{578} von 4.

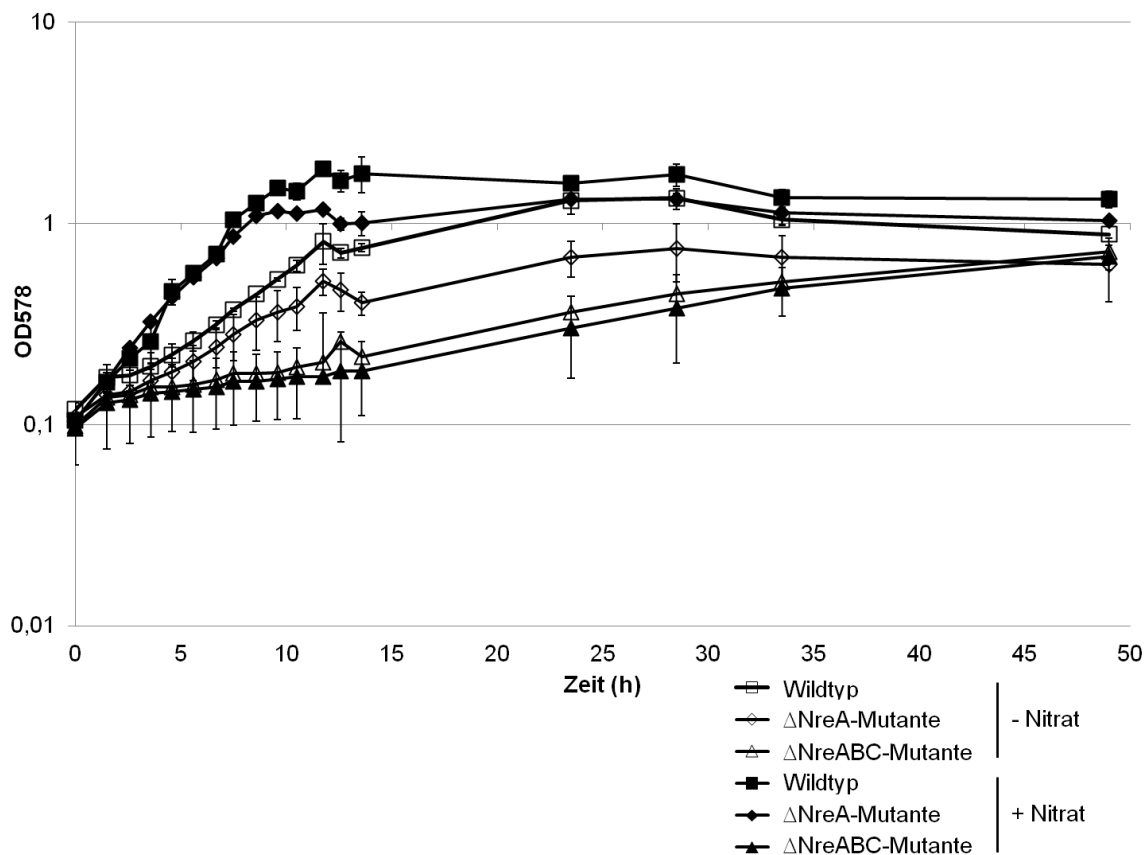


Abbildung 4.2: Anaerobes Wachstumsverhalten von *S. carnosus* Wildtyp und Nre Mutanten in definiertem Minimalmedium und optionalem Zusatz von Nitrat. Zucht der $\Delta NreABC$ -Mutante m1, der $\Delta NreA$ -Mutante und des Wildtypstamms TM300 in K-Medium mit Glukose als C-Quelle (10 mM) und optional Natriumnitrat (10 mM).

Unter anaeroben Bedingungen sollte sich die Anwesenheit von Nitrat im K-Medium, dagegen positiv auf das Wachstum auswirken.

In der Tat bewirkte die Nitratzugabe im Experiment unter anaeroben Bedingungen beim Wildtyp eine deutliche Steigerung des Wachstums (Abbildung 4.2). Auch die $\Delta nreA$ -Mutante erzielte mit Nitrat in kürzerer Zeit höhere Zelldichten als ohne Nitrat. Das Wachstum in den ersten 8 Stunden war mit dem des Wildtyps identisch und erreichte eine OD_{578} von 1. In der nitratfreien Zucht war das Wachstum der $\Delta nreA$ -Mutante gegenüber dem des Wildtyps etwas abgeschwächt.

Das Wachstum der $\Delta nreABC$ -Mutante war im Vergleich zum Wildtyp oder der $\Delta nreA$ -Mutante wesentlich langsamer. Auch die Zugabe von Nitrat bewirkte kein gesteigertes Wachstum. Nach 8 Stunden lag die beobachtete Zelldichte OD_{578} noch unter 0,1. Dieses Wachstumsdefizit wurde bereits bei Fedtke *et al.* (2002) beobachtet und mit dem Fehlen des Zweikomponentensystems NreBC begründet. Dennoch betrug die am Ende der Zucht

erreichte Zelldichte bei nitratunabhängiger, langsamer Wachstumsrate, eine OD_{578} von rund 0,7.

Zusammenfassend ist den Wachstumsexperimenten zu entnehmen, dass die Anwesenheit von NreBC, nicht jedoch von NreA nötig ist, um unter anaeroben Bedingungen eine Wachstumssteigerung durch Nitrat zu erzielen.

4.2 Gegenüberstellung von NreA und homologen Proteinen

NreA aus *S. carnosus* besitzt eine GAF-Domäne (cGMP-spezifische Cyclische-Nukleotid-Phosphodiesterase-Adenylatzyklase-Fh1A; Aravind und Ponting, 1997). Die Gruppe der GAF-Domänen zählt, wie die Gruppe der PAS-Domänen (Per-Arnt-Sim; Ponting und Aravind, 1997) zu einer der größten Domänengruppen mit Vertretern aus unterschiedlichsten Organismen. Es sind derzeit 16.092 GAF-Domänen aus 14.178 Proteinen annotiert (SMART nrdb Datei, http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do_annotation.pl?ACC=SM00065, Stand 09/2013). Meist haben GAF-Domänen Funktionen als Sensoren oder Signalüberträger und sind in der Lage, vor allem kleine Moleküle als Liganden zu binden (Ho *et al.*, 2000). GAF-Domänen sind sehr weit verbreitet, wobei sie unterschiedlichste Funktionen übernehmen können. Während die Primärsequenz von GAF-Domänen nur wenig konserviert ist, zeichnen sie sich vor allem durch ihre ähnlichen Sekundär- und Tertiärstrukturen aus (*same basic fold*, Martinez *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2000). GAF-Domänen bestehen aus rund 110 (Zoraghi *et al.*, 2004) bis 150 Aminosäuren (Levdikov *et al.*, 2009) und weisen in der Regel 5 - 6 β -Faltblätter und mehrere α -Helices auf. Dabei ordnen sich die β -Faltblätter antiparallel im Zentrum der Domäne an und werden von den α -Helices auf beiden Seiten flankiert (Huang *et al.*, 1993; Anantharaman *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2002 und 2005; Podust *et al.*, 2008). NreA besteht aus 155 Aminosäuren und setzt sich aus 5 β -Faltblättern und 7 α -Helices zusammen (Abbildung 4.3). Das bedeutet, dass sich die GAF-Domäne von NreA fast über das gesamte Protein erstreckt. Dies ist insofern interessant, als dass GAF-Domänen überwiegend als Untereinheiten von größeren Proteinen auftauchen. Bislang gibt es kaum Proteine, die so klein sind wie NreA, nur aus einer GAF-Domäne bestehen und die bezüglich ihrer Funktion untersucht sind. Ein Beispiel für ein Protein, das nur aus einer GAF-Domäne besteht, ist das 158 Aminosäuren große GafA aus *Dictyostelium discoideum* (Goldberg *et al.*, 2002). Hier ist die Funktion noch nicht experimentell untersucht, das Protein wurde aber anhand der Sequenzähnlichkeiten der Familie der freien Methionin(R)-sulfoxid-Reduktasen zugeordnet (Uniprot Q8MTJ7). Das Protein fRMsR, eine freie Methionin(R)-sulfoxid-Reduktase aus *E. coli* besteht aus 183 Aminosäuren (Lin *et al.*, 2007) und hat eine GAF-Domäne mit katalytischer Funktion. Die GAF-Domäne stellt auch hier die einzige Domäne des Proteins dar.

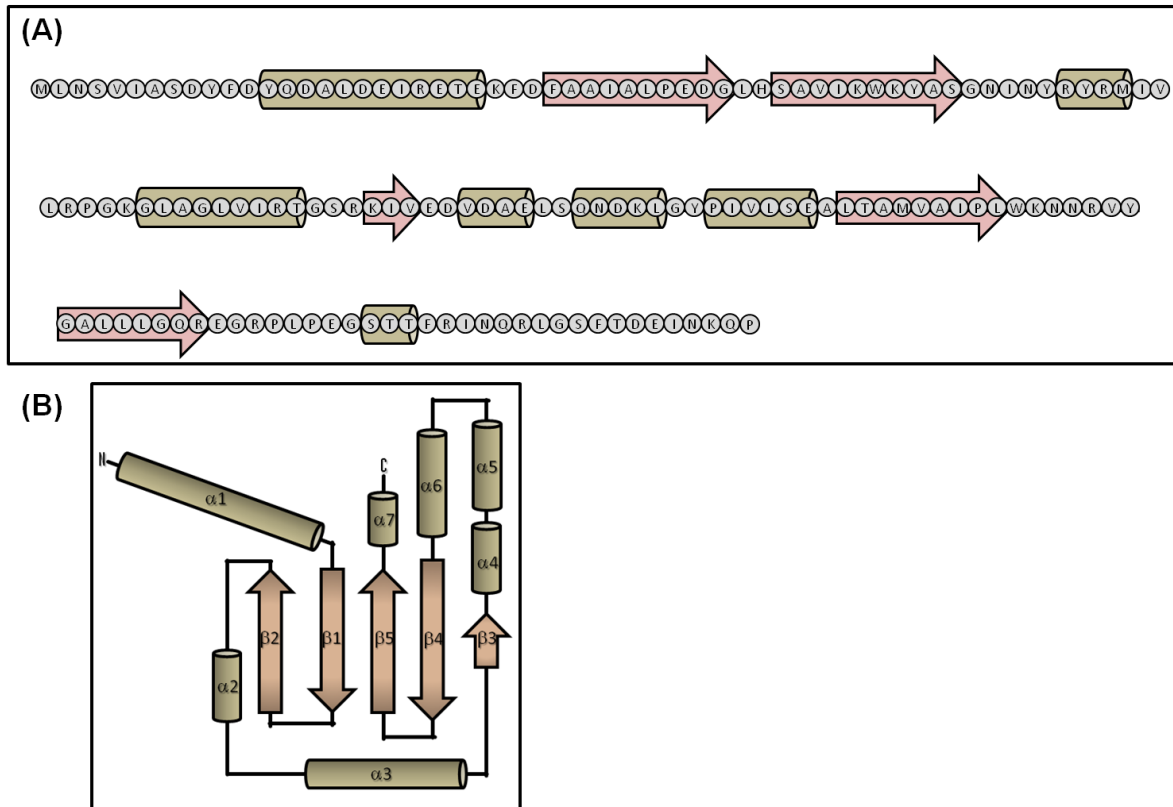


Abbildung 4.3: NreA von *S. carnosus*. Unter (A) sind in der Primärsequenz die Sekundärstrukturelemente (α -Helix: brauner Zylinder, β -Faltblatt: hellroter Pfeil) angegeben. Unter (B) sind die Sekundärstrukturelemente in der für GAF-Domänen charakteristischen Anordnung dargestellt.

Beim Vergleich der Primärsequenzen NreA-homologer Proteine untereinander sollte erkennbar sein, welche Aminosäurereste funktionell oder strukturell von besonderer Bedeutung sind. Im Laufe der Evolution zeigen sich in der Regel elementar wichtige Reste stärker konserviert als solche, die für die Funktion des Proteins eine untergeordnete Rolle spielen und deren Mutation keine funktionelle Veränderung nach sich zieht. Um solche Reste zu identifizieren, wurde NreA (Uniprot: B9DL91_STACT) mit dem BLAST-Algorithmus mit den Sequenzen der Datenbanken verglichen. Aus dem BLAST resultierende Sequenzen wurden ausgewertet. Von verwandten Arten wurde je ein Stamm ausgewählt und dessen Sequenz in das Programm CLUSTALW eingespeist. Dieses berechnete ebenfalls die Ähnlichkeit der Sequenzen. Zum Vergleich von NreA-homologen Proteinen mit NreA aus *S. carnosus* wurden letztendlich folgende Organismen ausgewählt: *S. aureus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *Lactobacillus antri*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Geobacillus sp.* und *Bacillus clausii* (verändert nach Singenstreu, 2010).

Das Resultat des Multiplen Alignments von NreA und seiner Homologen (Abbildung 4.4) wurde mit Hilfe des Programms GENEDOC dargestellt, wobei die „similarity groups“ Funktion verwendet wurde. Bei dieser Einstellung geben vier Graustufen den Grad der Konservierung an. Die schwarz hinterlegten Aminosäurereste sind dabei zu 100%, die dunkelgrau hinterlegten über 80% und die hellgrau hinterlegten mehr als 60% konserviert.

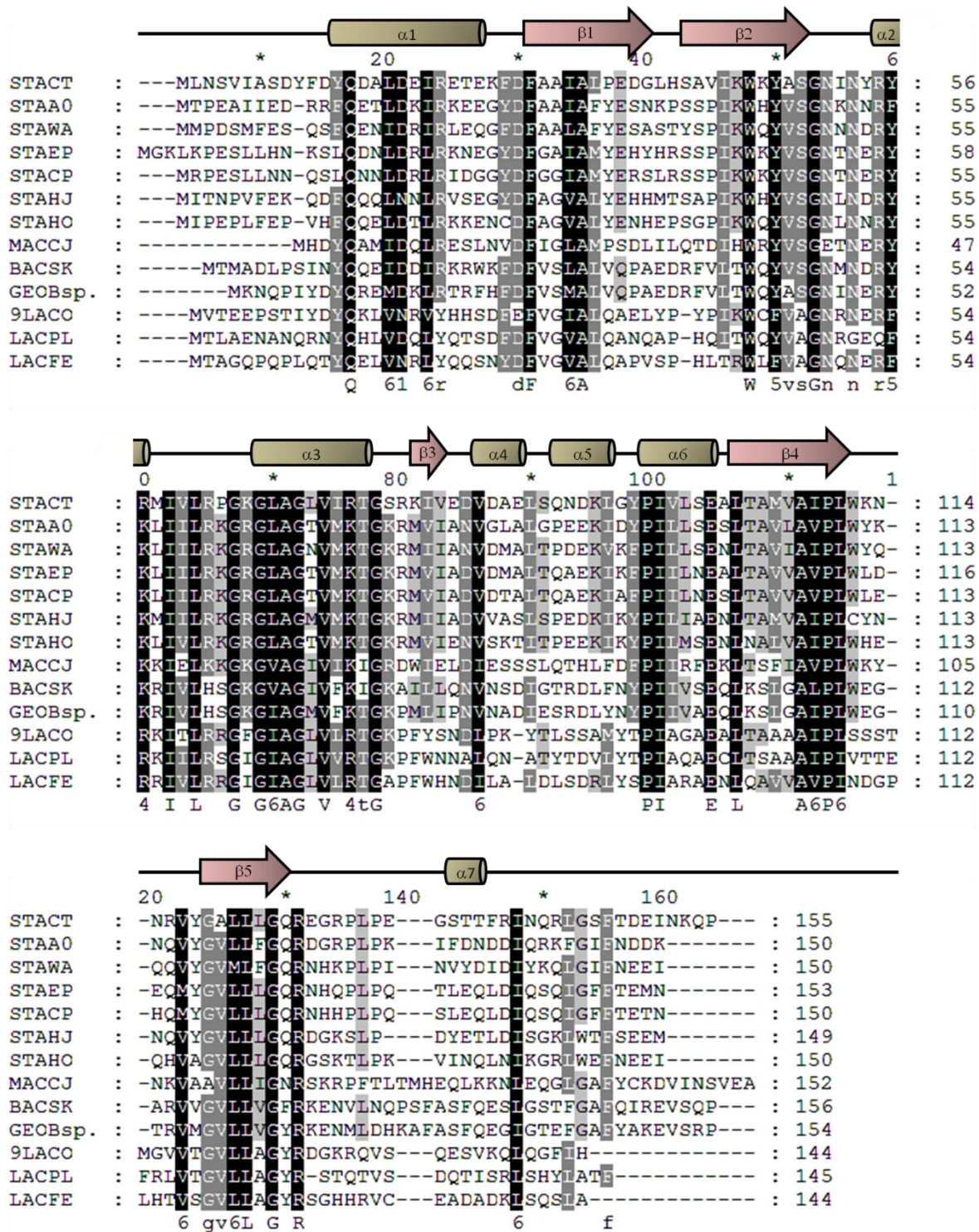


Abbildung 4.4: Multiples Alignment von NreA aus *S. carnosus* mit NreA-Homologen aus anderen Bakterien. Dargestellt ist das Multiple Alignment von NreA aus *S. carnosus* TM300 mit ausgewählten NreA-homologen Proteinen. Die Sequenzen wurden der Datenbank NCBI entnommen, mit CLUSTALW align und mit GENEDOC dargestellt. Unter Verwendung der „similarity groups“ Option von GENEDOC wurden die Reste wie folgt gekennzeichnet: Aminosäurereste mit 100% Identität = schwarzer Hintergrund, 80 - 99% = dunkelgrauer und 60 - 80% Ähnlichkeit = hellgrauer Hintergrund. Über dem Alignment ist die Sekundärstruktur von NreA aus *S. carnosus* (braun: α-Helix, rot: β-Faltblatt) angegeben. STACT *S. carnosus* TM300, STAA0 *S. aureus* TW20, STAWA *S. warneri* L37603, STAEP *S. epidermidis* M23864:W1, STACP *S. capitis* SK14, STAHJ *S. haemolyticus* JCS1435, STHO *S. hominis* SK119, MACCJ *Macrococcus caseolyticus* JCSC5402, BACSK *Bacillus clausii* KSM-K16, GEOBsp. *Geobacillus* sp. Y412MC10, 9LACO *Lb. antri* DSM16041, LACPL *Lb. plantarum*, LACFE *Lb. fermentum* 28-3-CHN (verändert nach Singenstreu, 2010).

Das Alignment ergab eine vollständige Konservierung von 24% der Reste und eine mindestens 60%-ige Übereinstimmung bei weiteren 28% der Aminosäurereste (Petrokovski, 1996; Margulies *et al.*, 2003). Die verglichenen Sequenzen sind demnach sehr ähnlich zueinander.

Die konservierten Aminosäuren befinden sich relativ verstreut über die gesamte Primärstruktur von NreA. Dazwischen liegen weniger konservierte Bereiche, vor allem bei der $\beta 1$ - $\beta 2$ -Schleife und der $\beta 4$ - $\beta 5$ -Schleife, sowie im mittleren Abschnitt bei $\beta 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$. Sowohl der N-Terminus (AS 1-12), als auch der C-Terminus (ab Rest 127) sind nicht oder nur gering konserviert.

Bei NreA handelt es sich also um ein Protein mit stark konservierter Sequenz, dessen Gen *nreA* immer zusammen mit *nreB* und *nreC* auf einem Operon vorkommt (Unden *et al.*, 2013). Durch gezielte Mutation von Proteinabschnitten oder einzelnen Aminosäuren kann man definierte Variationen von Proteinen kreieren. Studiert man die Auswirkung der Veränderungen auf die Funktion im Gesamtsystem, so lassen sich Rückschlüsse auf die Aufgabe und Funktionsweise eines Proteins ziehen. Dieser Ansatz wurde auch für die Untersuchungen an NreA gewählt. Entscheidend für die Aussagekraft solcher Experimente ist die sinnvolle Auswahl der durchzuführenden Mutationen.

4.3 Auswahl der NreA-Mutanten

Auf Basis des Multiplen Alignments wurden Aminosäurereste an unterschiedlichen Positionen im Protein ausgewählt. Kriterien zur Auswahl der Kandidaten waren neben dem Grad der Konservierung auch Aspekte wie Ladung oder Polarität, beziehungsweise die Lage in der vorhergesagten Protein-3D-Struktur (Singenstreu, 2010). Des Weiteren wurden Glycin- und Prolinreste nicht ausgewählt, da diese oftmals strukturelle und weniger funktionelle Bedeutung haben. Bei Aminosäureresten, die mehrmals mutiert wurden, basierte die Auswahl auf der in Kooperation mit der Universität Tübingen erhaltenen NreA-Kristallstruktur (siehe unten). Die auf dieser Grundlage ausgewählten und durchgeführten Mutationen sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Die ausgewählten Aminosäurereste wurden zielgerichtet mutiert und alle so erhaltenen Mutanten bezüglich ihres nitratabhängigen *narG-lip* Expressionsverhaltens unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht.

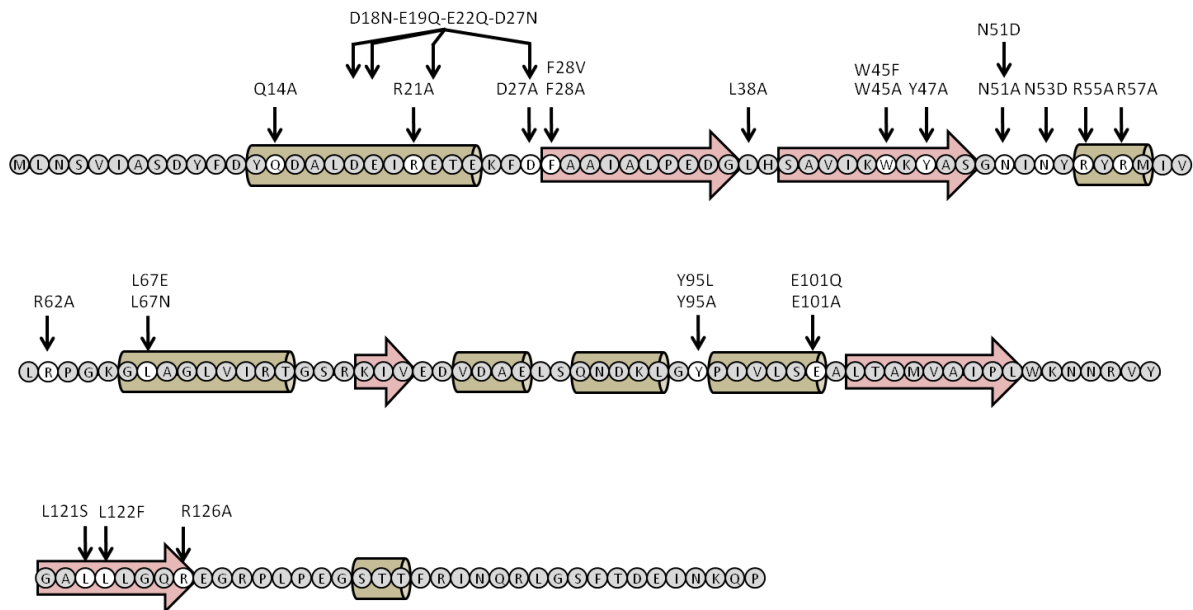


Abbildung 4.5: Mutierte Aminosäurereste in NreA von *S. carnosus*. Die mutierten Aminosäurereste sind in der Primärsequenz von NreA mit Pfeilen markiert. Die Sekundärstrukturelemente sind schematisch dargestellt (α -Helix: brauner Zylinder, β -Faltblatt: hellroter Pfeil).

4.4 NreA-Kristallstruktur mit Iodid oder Nitrat

In Kooperation mit dem Interfakultären Institut für Biochemie der Universität Tübingen (Prof. T. Stehle, V. Niemann) wurden zwei Kristallstrukturen von NreA erhalten und genauer analysiert. Zum einen konnte NreA mit Iodid als Ligand kristallisiert und die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,2 Å gelöst werden (Niemann *et al.*, 2013). Zum anderen gelang die Kristallisation mit Nitrat, wobei die Kristallstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2,35 Å erfolgreich war. Die beiden Gesamtstrukturen sind deckungsgleich, weshalb hier nur die NreA-Gesamtstruktur mit gebundenem Nitrat gezeigt ist (Abbildung 4.6).

Die Reste 1 bis 10, sowie 154 und 155 fehlen in der Darstellung. NreA zeigt im Zentrum die für GAF-Domänen typische, antiparallele β -Faltblattstruktur (β 1- β 5). Diese besteht im Gegensatz zu anderen GAF-Domänen nicht aus sechs (Ho *et al.*, 2000), sondern aus fünf β -Strängen mit der Anordnung 2-1-5-4-3. Diese ist auch bei der GAF-Domäne von DosT zu beobachten (Podust *et al.*, 2008). Auf der einen Seite des β -Faltblatts liegen die N- und C-Termini, sowie die lange Helix α 1 und die kurze Helix α 7. Auf der anderen Seite liegen die restlichen Helices (α 2 - α 6) und zahlreiche Schleifen (*loops*). Zwischen diesen Helices, den Schleifen und dem β -Faltblatt ist der gebundene Ligand lokalisiert. Iodid und Nitrat befinden sich in der gleichen Bindetasche, wie sie auch von anderen GAF-Domänen bekannt ist (Handa *et al.*, 2008; Essen *et al.*, 2008; Gruez *et al.*, 2010), wobei bislang keines dieser Anionen als Cofaktor bekannt war. Diese hydrophobe Tasche wird durch die Reste W45, I59, L61, G66, L67, A68, P96 und I97 gebildet und ist weitestgehend vom umgebenden Milieu abgeschirmt.

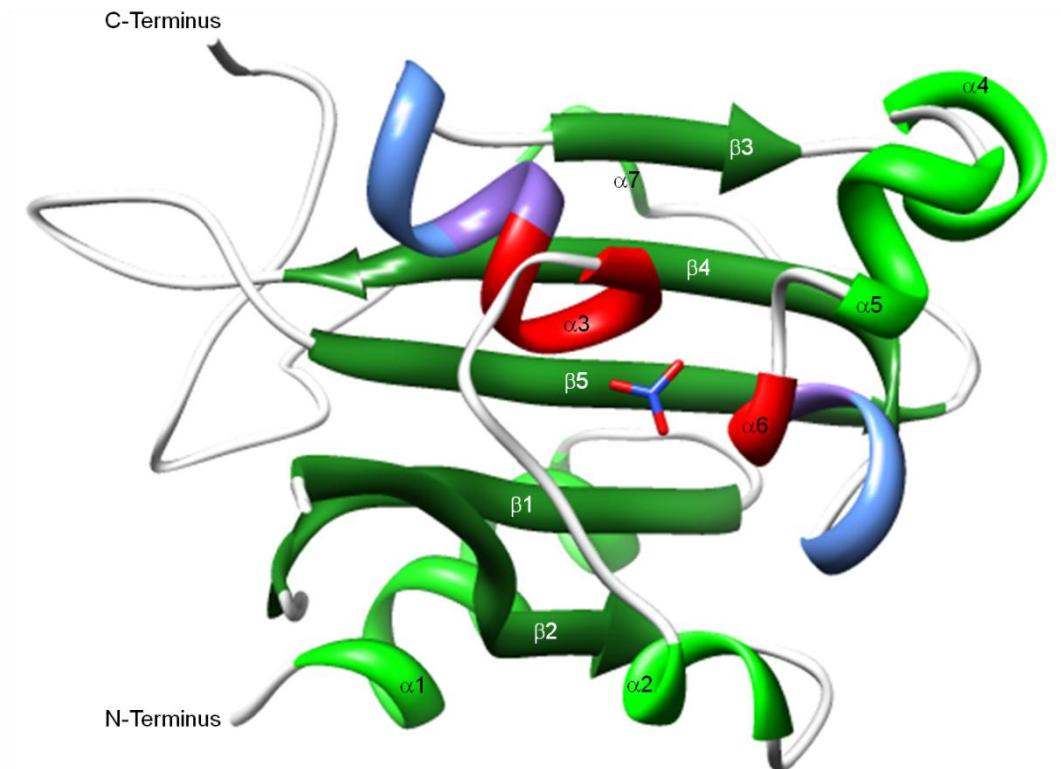


Abbildung 4.6: Kristallstruktur von NreA mit gebundenem Nitrat. In der Darstellung des Bändermodells sind die Dipolmomente der Helices $\alpha 3$ und $\alpha 6$ durch Farbgradienten (rot: positiv, blau: negativ) dargestellt. Die Dipolmomente kompensieren die negative Ladung des gebundenen Nitrats (verändert nach Niemann *et al.*, 2013).

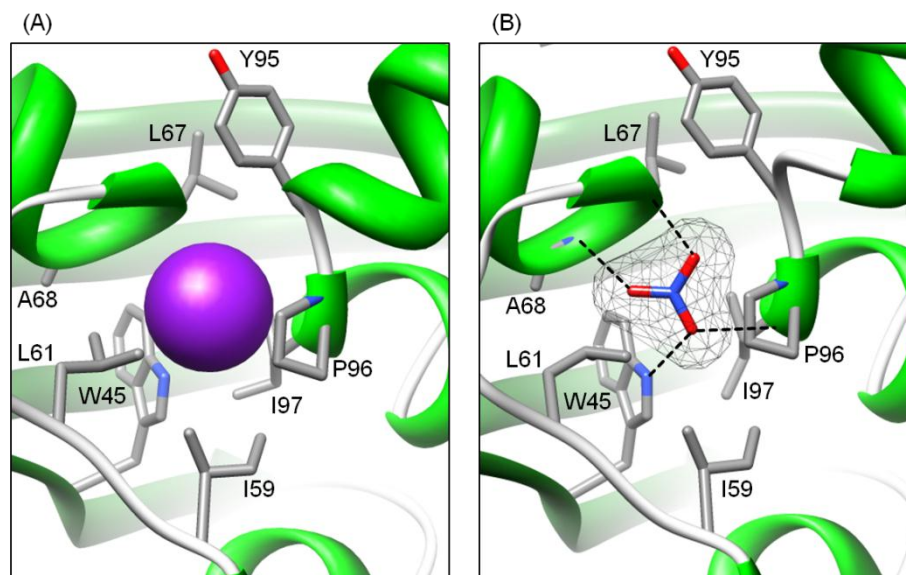


Abbildung 4.7: NreA-Bindungstasche mit gebundenem Iodid, beziehungsweise Nitrat. In der Bindungstasche von NreA werden Iodid (A) oder Nitrat (B) durch die gleichen Aminosäurereste gebunden. Die blauen Netze um die Anionen zeigen eine simulierte Elektronendichte (contour level 3.0σ) mit einem Radius von $2,5 \text{ \AA}$. Die schwarzen gestrichelten Linien in Abbildung B stellen die Wasserstoffbrücken zwischen NreA und Nitrat dar (verändert nach Niemann *et al.*, 2013).

Die negative Ladung des gebundenen Anions wird nicht durch positive oder polare Aminosäurereste über Salzbrücken oder polare Wechselwirkungen gebunden. Vielmehr wird die negative Ladung überwiegend durch die Dipolmomente der Helices $\alpha 3$ und $\alpha 6$

kompensiert und Iodid beziehungsweise Nitrat so in der Bindetasche fixiert. Helix $\alpha 6$ ist gegenüber von $\alpha 3$ positioniert, da P96 einen Knick zwischen $\alpha 5$ und $\alpha 6$ einfügt. Vier Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen den Aminosäureresten L67, A68, I97, W45 und dem Liganden ausgebildet werden, unterstützen die Bindung in NreA (Abbildung 4.7, schwarze gestrichelte Linien). Die Wasserstoffbrückenbindungen werden über die Amide des Rückgrats von L67, A68 und I97, sowie mit Hilfe des Protons am Indolstickstoff von W45 gebildet.

Alle Reste, die in der Nitratbindung und Ausbildung der hydrophoben Tasche involviert sind, sind stark konserviert (farbige Hinterlegung, Abbildung 4.8). Der Aminosäurerest Y95 liegt etwas außerhalb der eigentlichen Bindungstasche und ist demnach nicht direkt an der Fixierung des Liganden beteiligt. Zudem ist Y95 oberflächenexponiert (Abbildung 4.18). Die räumliche Distanz für eine Migration von Nitrat aus der Umgebung hinein in die Bindetasche von NreA ist hier sehr gering. Aufgrund seiner Lage ist daher für Y95 eine Funktion als eine Art Deckel über dem Bindungsraum denkbar.

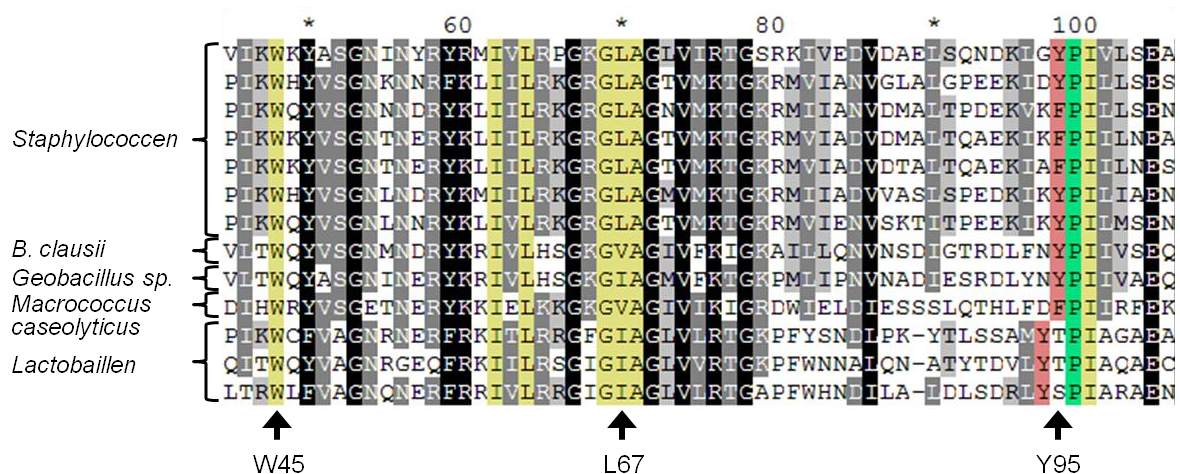


Abbildung 4.8: Ausschnitt aus dem Multiplen Alignment (Abbildung 21) mit gesonderter Hervorhebung wichtiger Aminosäurereste. Gezeigt ist der Ausschnitt von Nummer 45 - 105 (*S. carnosus*: 42 - 102) mit gelber Hinterlegung der Aminosäurereste, die an der Nitratbindung beteiligt sind. Y95, der Deckel der Bindungstasche ist in rosa, P96, den Knick zwischen $\alpha 5$ und $\alpha 6$ einführend, in grün markiert. Für Mutagenesestudien verwendete Reste (W45, L67, Y95) sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.5 Bedeutung von NreABC für die anaerobe Nitratatmung: *narG-lip*-Reporterstudien

Zur Untersuchung der NreABC-gesteuerten Regulation der Expression der Komponenten der Nitratatmung wurden Reporterstudien durchgeführt. Es sollte untersucht werden, wie sich Veränderungen im NreABC-System auf das Expressionsverhalten in Abhängigkeit von Sauerstoff und Nitrat auswirken. Dazu wurde die Reporterfusionsfusion *narG-lip* (Nilkens *et al.*, 2013) verwendet. Kommt es zur Induktion des Promotors *narG* der Nitratreduktase, so wird Lipase exprimiert, welche im Testsystem nachgewiesen werden kann. Die spezifische

Aktivität der Lipase kann demnach als ein Maß für die Induktion der Nitratatmungsgene erachtet werden.

Die ermittelten spezifischen Lipaseaktivitäten (sLA, [U/g dw], Units pro Trockengewicht) wurden aerob und anaerob jeweils in nitratfreien und nitrathaltigen Zuchten in der Mitte der exponentiellen Phase (OD_{578} von 0,5) bestimmt. Zunächst wurden die Stämme mit den Genotypen $\Delta nreABC$, Wildtyp (WT) und $\Delta nreA$ untersucht (Abbildung 4.9). Diese wurden durch Komplementierung der chromosomalen $\Delta nreABC$ -Mutante m1 ($\Delta nreABC::ermB$) mit den Plasmiden pMW1001 (*p-*), pMW1040 (*pnreABC*) und pMW1393 (*pnreBC*) erhalten. Im Folgenden dienten sie als Vergleichsstämme.

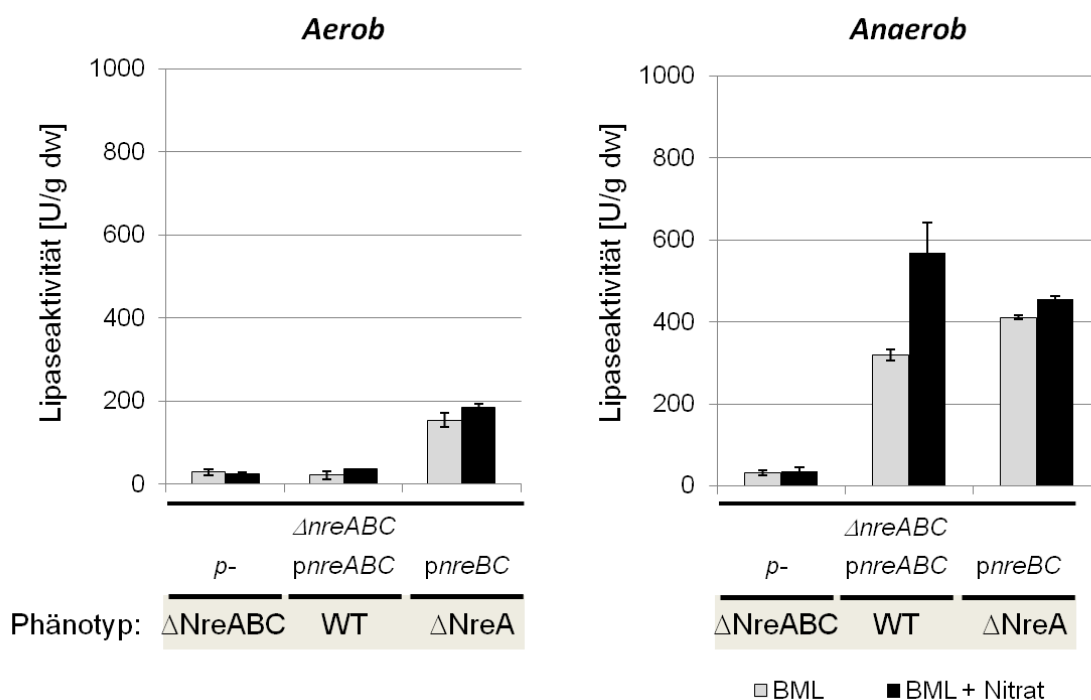


Abbildung 4.9: Lipaseaktivität (*narG-lip* Expression) der $\Delta nreABC$ -Mutante, des *NreABC*-Wildtyps und der $\Delta nreA$ -Mutante. Spezifische Lipaseaktivitäten unter aeroben (links) und anaeroben (rechts) Bedingungen sind dargestellt. Die $\Delta nreABC$ -Mutante m1 wurde mit den Plasmiden pMW1001 (*p-*), pMW1040 (*pnreABC*) und pMW1393 (*pnreBC*) komplementiert. Der Phänotyp ist grau hinterlegt. Graue Balken geben nitratfreie und schwarze Balken nitrathaltige (10 mM) Zuchten an.

Der Wildtyp-Stamm (WT) zeigte aerob minimale spezifische Lipaseaktivität (23 sLA). Durch Nitrat wurde diese um den Faktor 1,6 auf 38 sLA erhöht. Anaerob lag die spezifische Lipaseaktivität ohne Nitrat um den Faktor 14 höher als im aeroben Fall. In Abwesenheit von Sauerstoff bewirkte Nitrat eine weitere signifikante Steigerung. Der Wert lag mit Nitrat noch einmal um den Faktor 1,8 höher bei 570 sLA. Somit haben sowohl Anaerobiose als auch die Anwesenheit von Nitrat beim Wildtyp einen stimulierenden Einfluss.

Die $\Delta nreABC$ -Mutante war nicht in der Lage *narG-lip* zu induzieren. Sowohl aerob, als auch anaerob lag die spezifische Lipaseaktivität auf einem niedrigen Niveau von rund 30 sLA

(Hintergrundaktivität). Hier fehlt also die Fähigkeit, auf Nitratanwesenheit mit Expression der Nitratatmungsgene zu reagieren (OFF-Mutante).

Der Phänotyp $\Delta NreA$ zeigte im Gegensatz zum Wildtyp auch im Aeroben eine signifikante Expression von *narG-lip* von 155 sLA in der nitratfreien Zucht und 185 sLA in der nitrathaltigen Zucht. Dies entspricht in beiden Fällen dem 5- bis 6-fachen des Wildtyps. Durch Abwesenheit von Sauerstoff wurde die spezifische Lipaseaktivität ohne Nitrat im Vergleich zum aeroben Fall auf 411 sLA (Faktor 2,7) gesteigert. Die Anwesenheit von Nitrat führte zu kaum einem weiteren, positiven Effekt und lag unter den identischen Bedingungen mit 456 sLA nur bei 80% des wildtypischen Levels. Charakteristisch für die $\Delta NreA$ -Variante ist, dass der Effekt durch Nitratzusatz deutlich geringer ausfällt als beim Wildtyp oder bei der $\Delta NreABC$ -Mutante. Man beobachtet einen Faktor von 1,2 im aeroben und 1,1 im anaeroben Fall. Das Hauptcharakteristikum der $\Delta NreA$ -Variante (ON-Mutante) ist also die Nitratblindheit, die damit einhergeht, dass auch unter aeroben Bedingungen die Expression der Gene der Nitratatmung induziert wird (aerobe Derepression).

4.6 Komplementierungen zu wildtypischem NreABC-Phänotyp

Komplementiert man die $\Delta nreABC$ -Mutante mit plasmidcodiertem *nreABC* (pMW1040) oder die $\Delta nreA$ -Mutante mit *pnreA* (pMW1532), so ergibt sich in beiden Fällen wieder ein wildtypischer Genotyp (Abbildung 4.10). Die Ergebnisse der *narG-lip* Expressionsmessungen ergeben wildtypisches Verhalten bezüglich Lipaseexpression unter Anaerobiose und weiterer Stimulation durch Nitratanwesenheit. Der komplementierte $\Delta nreA$ -Stamm zeigte danach keine Nitratblindheit mehr und reprimiert unter aeroben Bedingungen die Lipase-Expression. Das dem wildtypischen Phänotyp charakteristische Expressionsmuster unter Aerobiose und Anaerobiose in Abhängigkeit von Nitrat wurde in beiden Stämmen festgestellt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass NreA eine wichtige Rolle in der Wahrnehmung von Nitrat bei *S. carnosus* spielt.

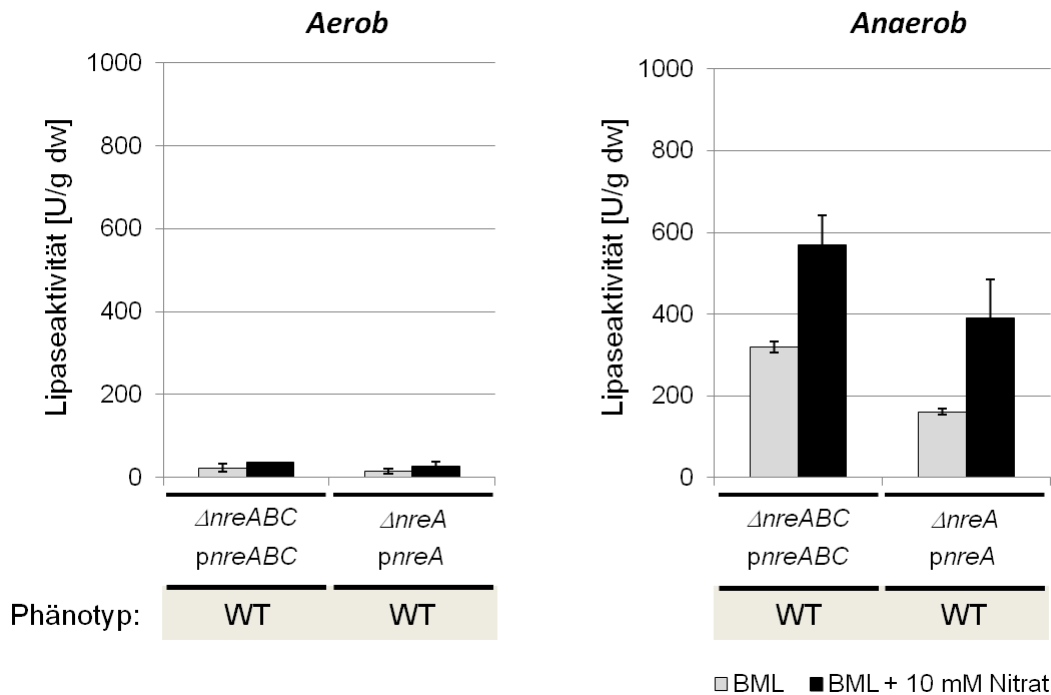


Abbildung 4.10: Lipaseaktivität (*narG-lip* Expression) von zwei konstruierten wildtypischen Geno- bzw. Phänotypen. Spezifische Lipaseaktivitäten unter aeroben (links) und anaeroben (rechts) Bedingungen sind dargestellt. Die $\Delta nreABC$ -Mutante m1 wurde mit dem Plasmid pMW1040 (*pnreABC*) und die $\Delta nreA$ -Mutante mit pMW1532 (*pnreA*) komplementiert. Der Phänotyp ist grau hinterlegt. Graue Balken geben nitratfreie und schwarze Balken nitrathaltige (10 mM) Zuchten an.

4.7 Einfluss von Mutationen in NreA auf die *narG-lip* Expression in Reporterstudien: drei Klassen von NreA-Varianten

Lässt sich die chromosomale Deletionsmutante $\Delta nreA$ durch plasmidcodiertes *nreA* zum Wildtyp komplementieren, so ist es interessant zu untersuchen, welchen Einfluss gezielte Veränderungen in NreA auf den Phänotyp der Mutanten haben. Über zielgerichtete Mutagenese auf dem Vektor *pnreABC* (pMW1040 oder pMW1041) wurden verschiedene NreA-Mutanten kreiert und deren spezifische Lipaseaktivitäten unter aeroben und anaeroben Bedingungen ohne und mit Nitrat in der Mitte der exponentiellen Phase (OD_{578} von 0,5) bestimmt.

Um den Effekt der Mutation in NreA bewerten zu können, wurden diese mit den komplementierten Stämmen mit den Phänotypen Wildtyp, $\Delta NreA$ und $\Delta NreABC$ verglichen.

Folgende Charakteristika wurden zur Beschreibung und Klassifizierung der Vergleichsstämme und der NreA-Mutanten herangezogen:

- Aerobe Expression (sLA) mit Nitrat im Vergleich zum Wildtyp in Prozent
- Aerobe Expression (sLA) ohne Nitrat im Vergleich zum Wildtyp in Prozent
- Aerober Nitratstimulus (Quotient aus den absoluten Werten der sLA mit Nitrat und ohne Nitrat)

- d) Anaerobe Expression (sLA) mit Nitrat im Vergleich zum Wildtyp in Prozent
- e) Anaerobe Expression (sLA) ohne Nitrat im Vergleich zum Wildtyp in Prozent
- f) Anaerober Nitratstimulus (Quotient aus den absoluten Werten der sLA mit Nitrat und ohne Nitrat)

Anhand der Summe der Kriterien wurden die NreA-Mutanten je einer Gruppe, Wildtyp, Δ NreABC/OFF oder Δ NreA/ON, zugeordnet.

Wildtypen zeichneten sich durch ausschließlich anaerobe *narG-lip*-Expression und weitere Stimulierung durch Nitrat aus. Bei Δ NreABC/OFF-Mutanten lag die *narG-lip*-Expression unter allen Bedingungen auf Hintergrundniveau. Die Zuordnung einer NreA-Mutante zur Klasse der Δ NreA/ON-Mutanten erfolgte, wenn die beiden Charakteristika *narG-lip*-Expression unter aeroben Bedingungen (Derepression) und Ausfall der Nitratstimulierung mit einem Faktor <1,5 („nitratblind“) erfüllt wurden. Dies ist in Abbildung 4.11 exemplarisch mit je einer stellvertretenden NreA-Mutante aus jeder Klasse gezeigt: NreA(W45A) für die Δ NreABC/OFF-Klasse, NreA(L38N) für die Klasse des Wildtyps und NreA(D27A) für die Δ NreA/ON-Klasse.

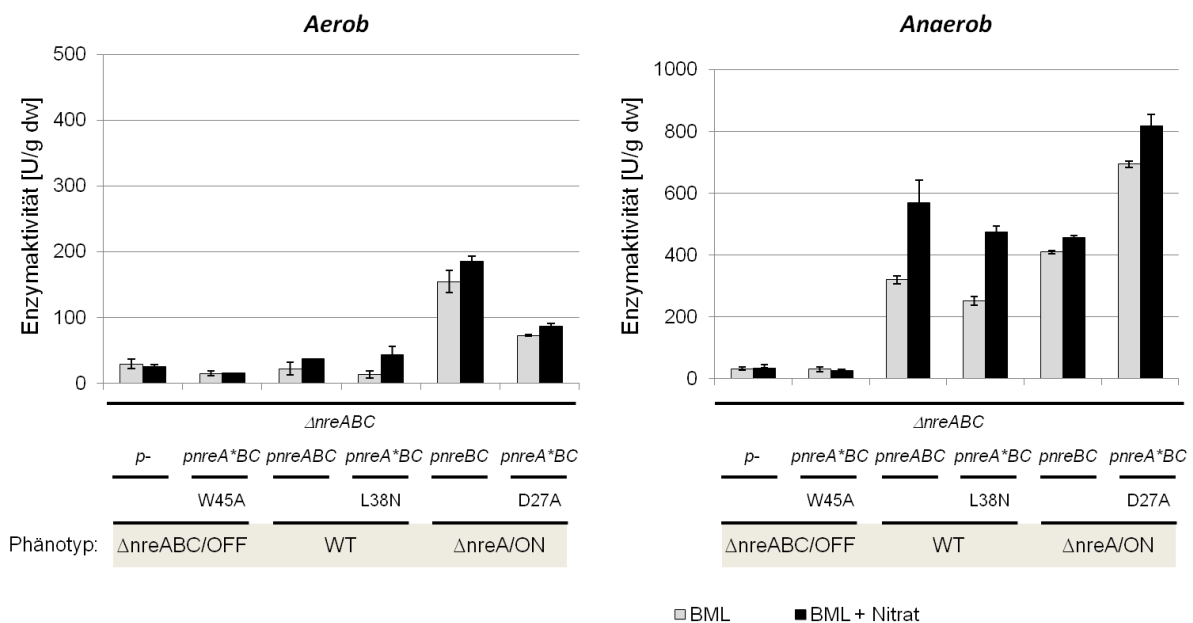


Abbildung 4.11: Lipaseaktivität (*narG-lip* Expression) von NreA-Mutanten. Die spezifische Lipaseaktivität wurde nach aerober (links) und anaerober (rechts) Zucht bestimmt. Die Δ nreABC-Mutante m1 wurde mit folgenden Plasmiden komplementiert: pMW1001 (Genotyp Δ nreABC), pMW1070 (Genotyp Δ nreA*BC, W45A), pMW1040 (Genotyp Wildtyp (WT)), pMW1640 (Genotyp Δ nreA*BC, L38N), pMW1393 (Genotyp Δ nreA) und pMW1454 (Genotyp Δ nreA*BC, D27A). Der Phänotyp ist grau hinterlegt. Graue Balken geben nitratfreie und schwarze Balken nitrathaltige (10 mM) Zuchten an.

4.7.1 NreA-Mutanten mit wildtypischem Phänotyp

Tabelle 4.1: Aerobe / anaerobe Lipaseexpression in Prozent des Wildtyp-Wertes mit Nitrat unter a / d und ohne Nitrat unter b / e, sowie aerober / anaerober Nitratstimulus als Quotient der absoluten Werte der sLA mit Nitrat und ohne Nitrat unter c / f. Gezeigt sind die Werte des Wildtyps und den Varianten NreA(Q14A), NreA(L38N), NreA(W45F), NreA(R57A) und NreA(Y95L).

	WT	Q14A	L38N	W45F	R57A	Y95L
a)	100	242	116	143	173	133
b)	100	126	60	123	121	144
c)	1,6	3,1	3,2	1,9	2,4	1,5
d)	100	107	83	47	113	99
e)	100	112	79	52	94	116
f)	1,8	1,7	1,9	1,6	2,1	1,5

Die Varianten NreA(Q14A), NreA(R57A), NreA(L38N) und NreA(W45F) verhielten sich wie der Wildtyp (Abbildung 4.12). Sie wiesen nur unter anaeroben Bedingungen *narG-lip*-Expression auf, welche durch die Anwesenheit von Nitrat gesteigert werden konnte. Die Mutationen Q14A und R57A in NreA bewirkten im Aeroben ohne Nitrat und im Anaeroben mit und ohne Nitrat wildtypisches Lipase-Expressionsverhalten. Die Aktivitäten der aeroben Zuchten mit Nitrat lagen mit 90 sLA beziehungsweise 65 sLA zwar höher als beim Wildtyp, in der Summe der Eigenschaften sind diese Mutanten aber der Wildtyp-Gruppe zuzuordnen. Das gleiche gilt für die Mutationen L38N und W45F in NreA, bei denen lediglich einzelne Expressionslevel etwas niedriger lagen als beim Wildtyp.

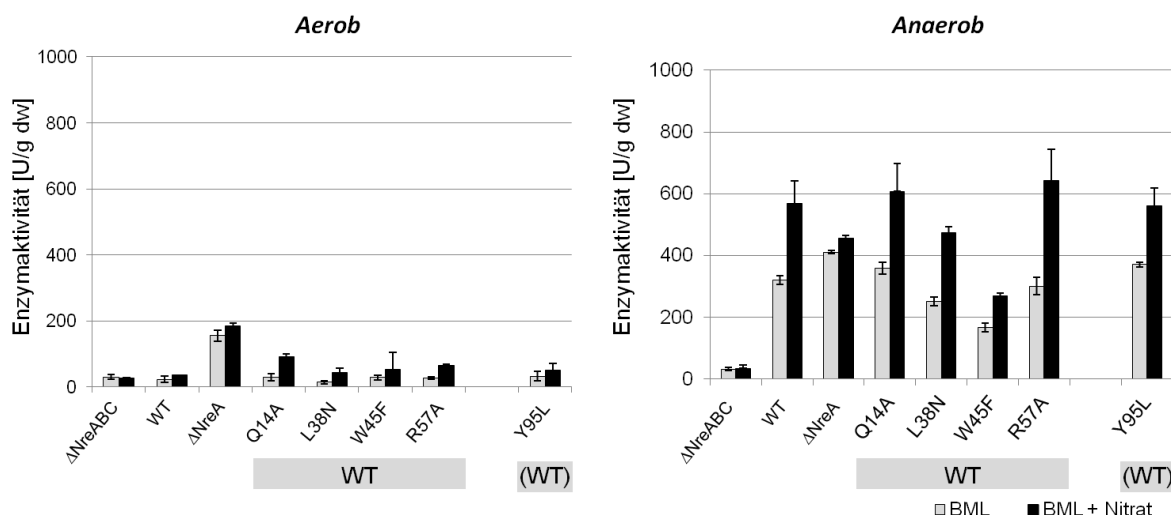


Abbildung 4.12: Lipaseaktivität (*narG-lip*) wildtypischer NreA-Varianten: Q14A, L38N, W45F und R57A, sowie Y95L. Spezifische Lipaseaktivitäten unter aeroben (links) und anaeroben (rechts) Bedingungen sind dargestellt. Die Δ *nreABC*-Mutante m1 wurde komplementiert mit folgenden Plasmiden: pMW1001 (*p-*), pMW1040 (*pnreABC*), pMW1393 (*pnreBC*) und Derivaten von pMW1040, codierend für die NreA-Varianten. Der Phänotyp ist grau hinterlegt. Graue Balken geben nitratfreie und schwarze Balken nitrathaltige (10 mM) Zuchten an. Y95L zeigt abgeschwächt wildtypischen Phänotyp.

4.7.2 NreA-Mutante mit abgeschwächt wildtypischem Phänotyp

Die Mutante NreA(Y95L) zeigte einen interessanten Phänotyp (Abbildung 4.12). Die absoluten Expressionslevel im Anaeroben waren wildtypisch. Auch im Aeroben waren sie mehr wildtypisch als Δ NreA-mäßig. Sowohl im Anaeroben, als auch im Aeroben beobachtete man einen stimulierenden Effekt durch Nitrat. Der Faktor von 1,5 ist niedriger als beim Wildtyp (1,8) und liegt damit zwischen Wildtyp- und Δ NreA-Charakteristik. In der Summe der Eigenschaften weist die Mutante jedoch einen prinzipiell wildtypischen Phänotyp auf.

4.7.3 NreA-Mutanten mit Δ NreABC/OFF-Phänotyp

Die Varianten NreA(R21A), NreA(W45A), NreA(Y47A), NreA(Y95A) und NreA(L121S) verhielten sich wie die Δ NreABC-Mutante (Abbildung 4.13). Sie gliedern sich in der Klasse der Δ NreABC/OFF-Mutanten ein, da sie weder unter aeroben noch anaeroben Bedingungen *narG-lip*-Expression aufwiesen. Die NreA(N51A)-Mutante erreichte im Anaeroben nur 10% des Lipase-Expressionsniveaus des Wildtyps und gleicht daher ebenfalls der Δ NreA/OFF-Mutante. Sie ist als Δ NreA/OFF-Mutante einzuordnen, obwohl das aerobe Expressionslevel über dem des Wildtyps liegt. NreA(E101A) und NreA(L67E) waren durch die ausbleibende *narG-lip*-Expression unter Anaerobiose ebenfalls als zwei Mutanten der Klasse der Δ NreA/OFF-Mutante zu werten, obwohl ein erhöhtes, aerobes Lipase-Expressionslevel bei beiden und zusätzlich die Beobachtung einer Stimulation durch Nitrat bei NreA(E101A) (Faktor 1,7 aerob und 1,6 anaerob) in dieser Klasse untypisch sind.

Tabelle 4.2: Aerobe / anaerobe Lipaseexpression in Prozent des Wildtyp-Wertes mit Nitrat unter a / d und ohne Nitrat unter b / e, sowie aerober / anaerober Nitratstimulus als Quotient der absoluten Werte der sLA mit Nitrat und ohne Nitrat unter c / f. Gezeigt die Werte sind vom Δ NreA und den Varianten NreA(R21A), NreA(W45A), NreA(Y47A), NreA(N51A), NreA(L67E), NreA(Y95A), NreA(E101A) und NreA(L121S).

	Δ NreABC/ OFF	R21A	W45A	Y47A	N51A	L67E	Y95A	E101A	L121S
a)	68	67	44	96	128	178	66	144	69
b)	131	103	67	138	171	301	114	142	107
c)	0,9	1,1	1,1	1,1	1,2	0,9	1,0	1,7	1,1
d)	6	3	5	10	10	10	10	14	5
e)	10	9	10	17	23	16	14	16	8
f)	1,1	0,6	0,9	1,0	0,8	1,1	1,3	1,6	1,1

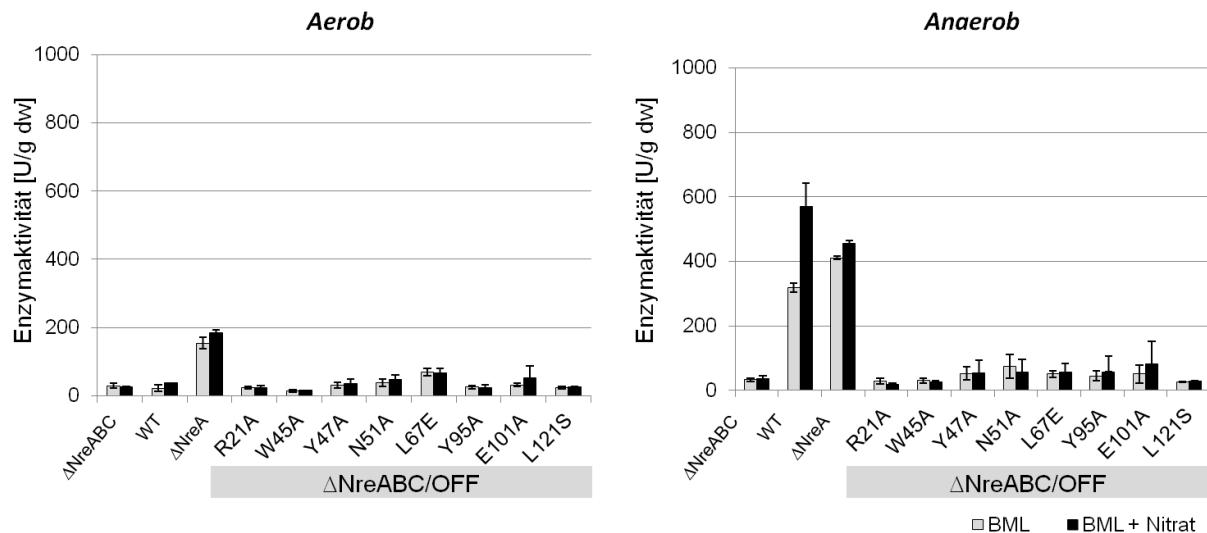


Abbildung 4.13: Lipaseaktivität (*narG-lip*) der NreA-Varianten mit Δ NreABC/OFF-Phänotyp: R21A, W45A, Y47A, N51A, L67E, Y95A, E101A und L121S. Spezifische Lipaseaktivitäten unter aeroben (links) und anaeroben (rechts) Bedingungen sind dargestellt. Die Δ nreABC-Mutante m1 wurde komplementiert mit folgenden Plasmiden: pMW1001 (*p-*), pMW1040 (*pnreABC*), pMW1393 (*pnreBC*) und Derivaten von pMW1040, codierend für die NreA-Varianten. Der Phänotyp ist grau hinterlegt. Graue Balken geben nitratfreie und schwarze Balken nitrathaltige (10 mM) Zuchten an.

4.7.4 NreA-Mutanten mit Δ NreA/ON-Phänotyp

Alle NreA-Mutanten der Δ NreA/ON-Phänotyp-Gruppe zeichnen sich durch aerobe *narG-lip*-Expression sowohl in der nitratfreien, als auch in der nitrathaltigen Zucht aus (Abbildung 4.14). Dabei bewegen sich die Werte in unterschiedlich deutlichem Maß über den entsprechenden Werten des Wildtyps. Bei der vierfach mutierten NreA(D18N-E19Q-E22Q-D27N)-Variante beispielsweise lag die Induktion von *narG-lip* in der nitratfreien Zucht 3,5-fach über der des Wildtyps und steigerte sich bis um das 18-fache bei NreA(R126A). Die ebenfalls charakteristische Nitratblindheit (Faktor 1,2 aerob, beziehungsweise Faktor 1,1 anaerob) des Δ NreA/ON-Phänotyps war außer bei den aeroben Messungen von NreA(F28V) und NreA(N53D) sowohl im Aeroben als auch im Anaeroben bei allen NreA-Varianten zu beobachten. Die NreA(R62A)-Variante bewirkte sowohl aerob als auch anaerob bei Nitratzusatz eine *narG-lip*-Expressionssteigerung um einen Faktor von 1,5. Dieser liegt damit genau im Grenzbereich zur wildtypischen Nitratstimulierung (Faktor 1,8). NreA(R62A) fällt in der Summe der Eigenschaften aber in die Klasse der Δ NreA/ON-Mutanten, da unter aeroben Zuchtbedingungen mit und ohne Nitrat außerordentlich hohe Lipaseexpressionen beobachtet wurden, die sogar die Aktivität der Δ NreA-Mutante deutlich übertrafen (Faktor 2). Unter Anaerobiose lagen die Lipaseaktivitäten etwas über denen des Wildtyps. NreA(F28A) verhielt sich bezüglich der Lipaseexpression wie die Δ NreA-Mutante. Dies ist wahrscheinlich weniger auf den Einfluss der Mutation selbst, sondern auf die Instabilität von NreA(F28A) *in vivo* zurückzuführen. Es scheint, als ob die Mutante gar nicht erst gebildet wird – mittels

Western Blot Analyse war diese NreA-Variante nicht nachweisbar (vgl. Abschnitt 4.9) – und die Mutante aus diesem Grund deutlich als ON-Mutante zu klassifizieren ist.

Tabelle 4.3: Aerobe / anaerobe Lipaseexpression in Prozent des Wildtyp-Wertes mit Nitrat unter a / d und ohne Nitrat unter b / e, sowie aerober / anaerober Nitratstimulus als Quotient der absoluten Werte der sLA mit Nitrat und ohne Nitrat unter c / f. Gezeigt die Werte sind vom Δ NreA und den Varianten NreA(D18N-E19Q-E22Q-D27N), NreA(D27A), NreA(F28A), NreA(F28V), NreA(N51D), NreA(N53D), NreA(R55A), NreA(R62A), NreA(R126A) und NreA(L67N).

	Δ NreA/ ON	D18N E19Q E22Q D27N	D27A	F28A	F28V	N51D	N53D	R55A	R62A	R126A	L67N
a)	495	264	233	856	465	306	791	495	1288	1542	184
b)	682	387	322	1204	408	452	609	575	1382	2345	238
c)	1,2	1,1	1,2	1,2	1,9	1,1	2,1	1,4	1,5	1,1	1,3
d)	80	156	144	74	136	99	98	77	121	121	66
e)	128	234	217	123	209	126	134	95	145	205	149
f)	1,1	1,2	1,2	1,1	1,2	1,4	1,3	1,4	1,5	1,1	0,8

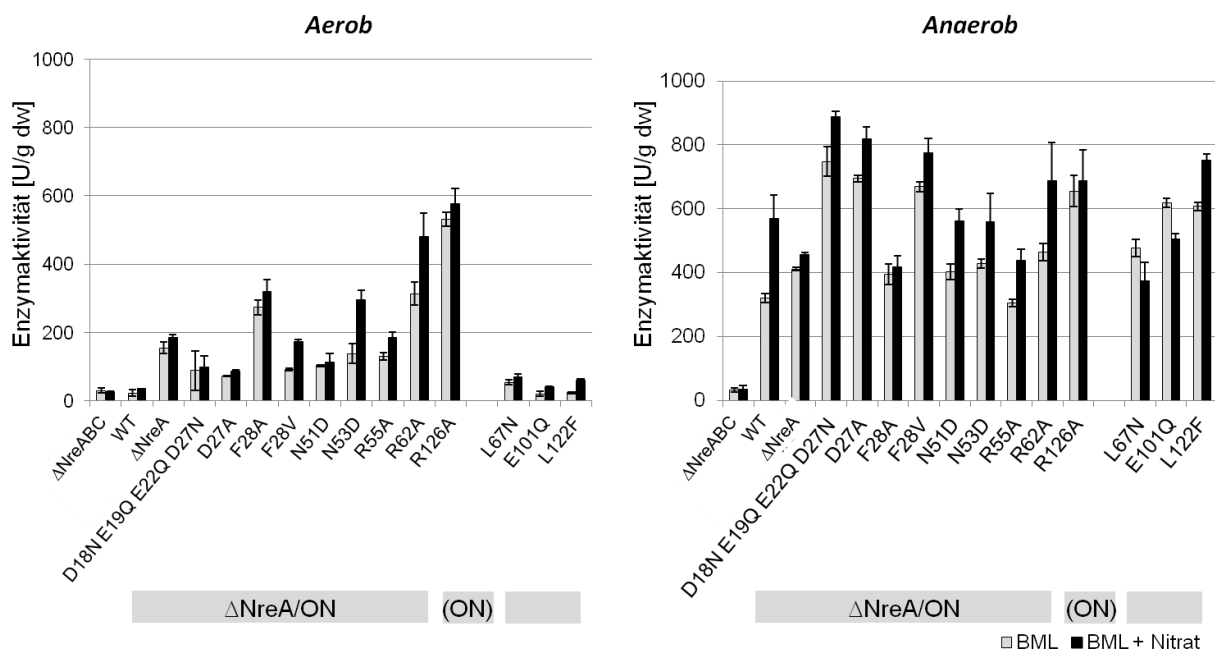


Abbildung 4.14: Lipaseaktivität (*narG-lip*) der NreA-Varianten mit Δ NreA/ON-Phänotyp: D18N-E19Q-E22Q-D27N, D27A, F28A, F28V, N51D N53D, R55A, R62A und R126A, zusammen mit dem abgeschwächten (ON)-Phänotyp L67N und den unklassifizierbaren NreA-Varianten E101Q und L122F. Spezifische Lipaseaktivitäten unter aeroben (links) und anaeroben (rechts) Bedingungen sind dargestellt. Die Δ nreABC-Mutante m1 wurde komplementiert mit folgenden Plasmiden: pMW1001 (*p-*), pMW1040 (*pnreABC*), pMW1393 (*pnreBC*) und Derivaten von pMW1040, codierend für die NreA-Varianten. Der Phänotyp ist grau hinterlegt. Graue Balken geben nitratfreie und schwarze Balken nitratenthaltige (10 mM) Zuchten an. L67N mit abgeschwächtem (ON)-Phänotyp. E101Q und L122F mit abweichendem Phänotyp werden unter 4.7.5 gesondert diskutiert.

4.7.5 NreA-Mutante mit abgeschwächtem Δ NreA/ON-Phänotyp

NreA(L67N) lässt sich nur in eingeschränkter Form der Δ NreA/ON-Mutantenklasse zuordnen (Abbildung 4.14). Im Aeroben ohne und mit Nitrat befindet sich das Niveau der spezifischen Lipaseaktivität über dem des Wildtyps (237% ohne Nitrat, 184% mit Nitrat). Im Anaeroben

beobachtete man jedoch den Verlust des Nitratstimulus (Faktor 0,8) – ein Indiz für Δ NreA-typisches Verhalten.

4.7.6 Mutanten mit abweichenden Phänotypen

Der Phänotyp von NreA(E101Q) war unklar (Abbildung 4.14). Während im Aeroben das absolute Expressionslevel wildtypisch und ein stimulierender Nitrategieffekt zu beobachten war (Faktor 2,0; Tabelle 4.4), lag im Anaeroben kein Stimulus durch Nitrat vor (nitratblind). Je nach Gewichtung der Indizien, fällt NreA(E101Q) in die Wildtyp- oder Δ NreA-Kategorie.

Der Phänotyp von NreA(L122F) war ebenfalls unklar. Im Aeroben ohne Nitrat war das Expressionslevel als wildtypisch einzustufen, im Aeroben mit Nitrat lag dieses nur geringfügig darüber. Ein stimulierender Effekt durch Nitratzusatz konnte beobachtet werden (Faktor 2,6). Dagegen lag im Anaeroben keine Stimulierung durch Nitrat vor (nitratblind). Auch NreA(L122F) kann je nach Gewichtung der vorliegenden Daten der Wildtyp- oder Δ NreA-Kategorie zugeordnet werden.

Tabelle 4.4: Aerobe / anaerobe Lipaseexpression in Prozent des Wildtyp-Wertes mit Nitrat unter a / d und ohne Nitrat unter b / e, sowie aerober / anaerober Nitratstimulus als Quotient der absoluten Werte der sLA mit Nitrat und ohne Nitrat unter c / f. Gezeigt die Werte sind vom Δ NreA und den Varianten NreA(E101Q) und NreA(L122F).

	E101Q	L122F
a)	108	161
b)	89	103
c)	2,0	2,6
d)	89	132
e)	193	190
f)	0,8	1,2

Die 25 konstruierten NreA-Mutanten konnten in der Mehrheit den drei Vergleichsphänotypen zugeordnet werden. Acht NreA-Mutanten (R21A, W45A, Y47A, N51A, L67E, Y95A, E101A, L122F) wurden dem Δ NreABC/OFF-mäßigen Phänotyp zugeordnet. Fünf NreA-Mutanten (Q14A, L38N, W45F, R57A, Y95L) wurden als Wildtypen identifiziert. Zehn NreA-Mutanten (D18N-E19Q-E22Q-D27N, D27A, F28A, F28V, N51D, N53D, R55A, R62A, L67N, R126A) ähneln in der Summe ihrer Charakteristika dem Δ NreA/ON-Phänotyp. Bei den zwei verbleibenden NreA-Mutanten (E101Q, L122F) ist keine eindeutige Zuordnung zu einer der drei Klassen möglich. Sie bewegen sich zwischen wildtypischem und Δ NreA-mäßigem Phänotyp. In Abbildung 4.15 sind die NreA-Mutanten in der Sekundärstruktur von NreA dargestellt (vgl. Abbildung 4.5). Zusätzlich ist mit farbigen Pfeilen ihr Phänotyp unter aeroben (von oben) und anaeroben (von unten) Bedingungen visualisiert. Es ist aus der Lage innerhalb der Sekundärstruktur keine deutliche Clusterung von ON- oder OFF-Phänotypen erkennbar.

Zum Verständnis der Phänotypen der NreA-Varianten ist daher ihre Lage innerhalb der Tertiärstruktur von übergeordneter Bedeutung. Dies wird im nächsten Abschnitt betrachtet.

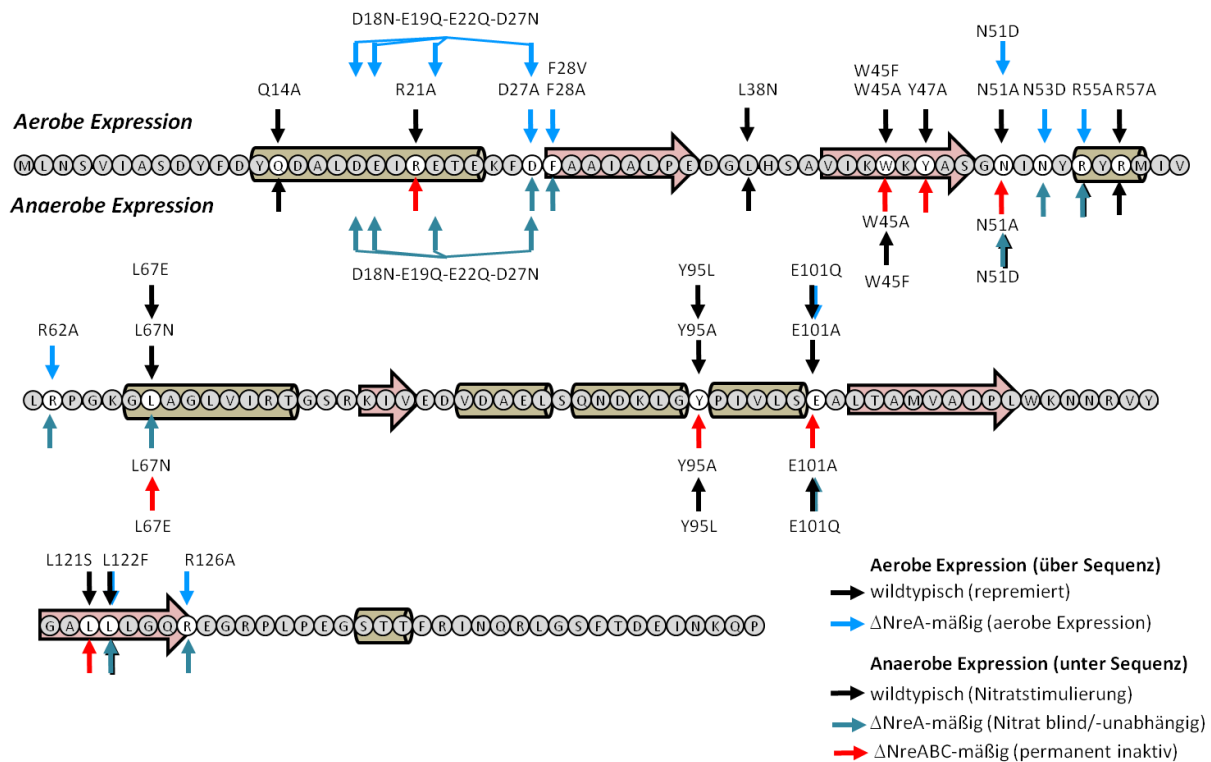


Abbildung 4.15: Klassifizierung der Phänotypen der NreA-Mutanten. Dargestellt ist die Primärsequenz von NreA mit Sekundärstrukturelementen (α -Helix: brauner Zylinder, β -Faltblatt: hellroter Pfeil). Die NreA-Mutanten sind mit Pfeilen markiert. Schwarze Pfeile symbolisieren wildtypischen Phänotyp der *narG-lip* Expression, blaue Pfeile Δ NreA-mäßigen Phänotyp und rote Pfeile Δ NreABC-mäßigen Phänotyp. Pfeile von oben beziehen sich auf das aerobe Expressionsverhalten, Pfeile von unten auf das anaerobe.

4.8 Korrelation zwischen Lage der mutierten Aminosäurereste im NreA-Kristall und ihrer *narG-lip* Expression

4.8.1 An der Nitratbindung beteiligte Reste in der Nitratbindetasche

Die Reste W45, L67 und Y95 sind stark konserviert. Im Kristall liegen sie in räumlicher Nähe zueinander und im Bereich der Bindetasche von Nitrat. Y95 ist zusätzlich oberflächenexponiert.

Die erstellten NreA-Varianten dieser Reste W45A, W45F, Y95A, Y95L, L67E und L67N zeigen deutlich unterschiedliche Phänotypen in Abhängigkeit davon, gegen welche Reste sie substituiert wurden (Abbildung 4.16). Durch Vergleich der erhaltenen Phänotypen mit der Lage des Restes innerhalb des NreA-Proteins konnten Schlüsse auf die Funktion der Reste gezogen werden.

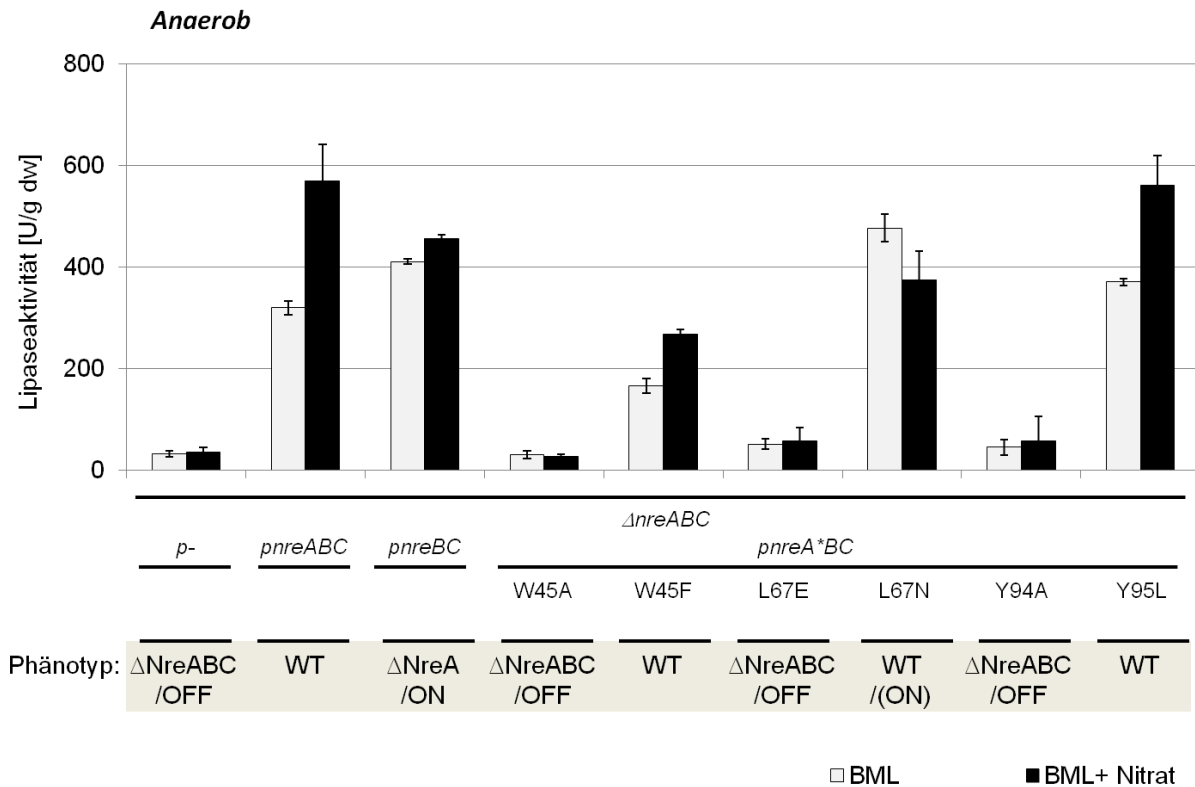


Abbildung 4.16: Lipaseaktivität (*narG-lip* Expression) von NreA-Mutationen innerhalb der Bindungstasche. Spezifische Lipaseaktivitäten unter anaeroben Bedingungen sind dargestellt. Die $\Delta nreABC$ -Mutante m1 wurde mit den Plasmiden pMW1001 (p-), pMW1040 (*pnreABC*), pMW1393 (*pnreBC*) und Derivaten von pMW1040 (*pnreA*BC*), codierend für NreA-Varianten (W45A, W45F, L67E, L67N, Y95A, Y95L), komplementiert. Der Phänotyp ist grau hinterlegt. Graue Balken geben nitratfreie und schwarze Balken nitrathaltige (10 mM) Zuchten an.

Laut Kristallstruktur ist W45 unmittelbar an der Bindung von Nitrat beteiligt. Die Substitution von Tryptophan gegen Alanin bei der $\Delta NreABC/OFF$ -Variante NreA(W45A) führt dazu, dass von diesem Aminosäurerest keine Wasserstoffbrückenbindung mehr ausgebildet werden kann. Zudem ist Alanin weniger raumfüllend als Tryptophan. Der Austausch von Tryptophan gegen Phenylalanin bei W45F erzielte dagegen einen wildtypischen Phänotyp. Phenylalanin kann wie Alanin keine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden, ist aber ähnlich voluminös wie Tryptophan.

Die Substitution von Leucin gegen Asparagin bei NreA(L67N) führte zu einer Mutante mit abgeschwächtem $\Delta NreA/ON$ -Phänotyp. Der polare Charakter des Asparagins bewirkte eine Nitratblindheit und leichte aerobe Derepression. Nach Ersatz des Leucinrestes durch einen Aspartatrest in NreA(L67E) erhielt man eine $\Delta NreABC/OFF$ -Mutante. Die negative Ladung des Aspartatrestes verändert demnach den Phänotyp signifikant.

Dem Rest Y95 kann aufgrund der Oberflächenexposition eine Funktion als Deckel der Bindetasche zugesprochen werden (Abbildung 4.19). Die Substitution von Tyrosin gegen das kleine Alanin bei NreA(Y95A) entspräche folglich einer „deckellosen“ NreA-Variante. Der

längerkettige aliphatische Rest von Leucin konnte den wildtypischen Phänotyp in NreA(Y95L) annähernd rekonstituieren.

Zusammenfassend erkennt man, dass in der Nitratbindetasche ein Austausch der Aminosäurereste von polar zu unpolar und umgekehrt, sowie von groß zu klein, einen maßgeblichen Einfluss auf den resultierenden Phänotyp hat. Die untersuchten Reste in NreA sind folglich von funktioneller Bedeutung für die Nitratwahrnehmung.

4.8.2 In der Peripherie liegende Reste

Bei den anderen 19 NreA-Varianten handelt es sich um Mutationen, die die Nitratbindetasche nicht direkt betreffen.

Von 19 NreA-Varianten erwiesen sich nur drei als wildtypisch, aber fünf Varianten zeigten einen Δ NreABC/OFF-Phänotyp und neun einen Δ NreA/ON-Phänotyp. Um die Phänotypen zu deuten, wurden die Lagen der entsprechenden Reste innerhalb der Tertiärstruktur betrachtet, wobei die Nitrat enthaltende NreA-Kristallform als Diskussionsgrundlage verwendet wurde.

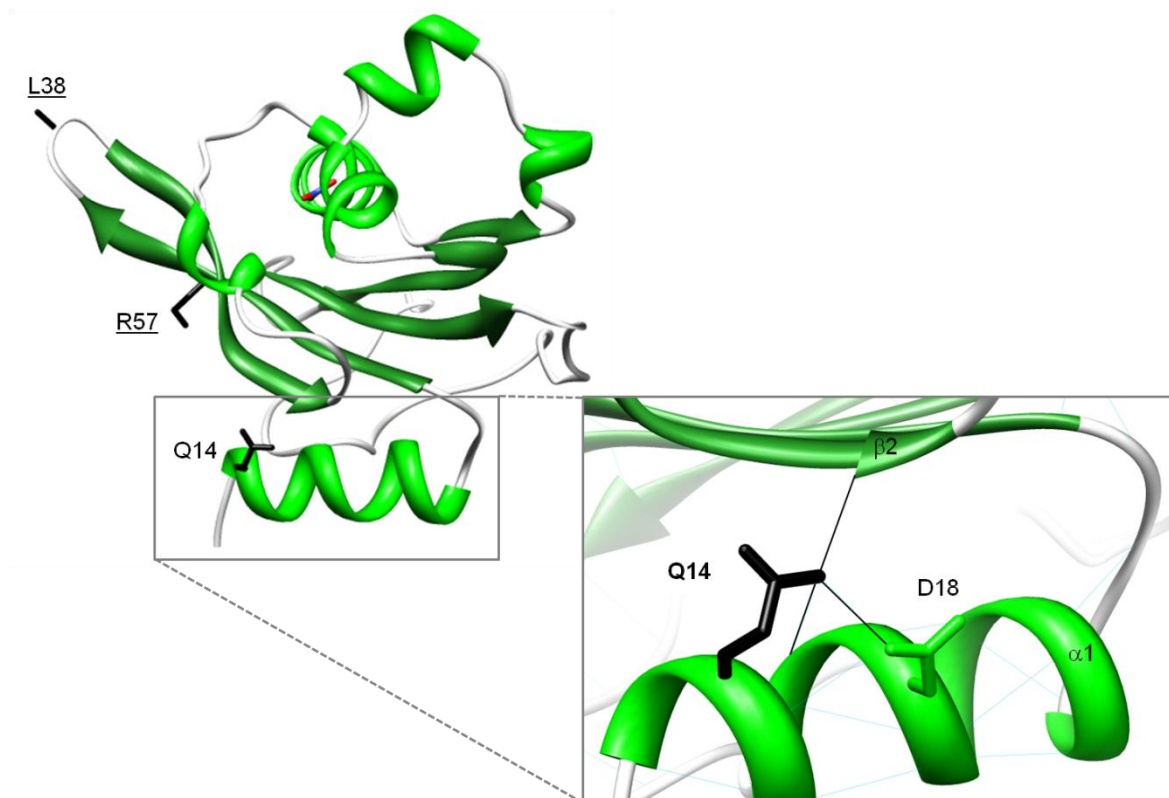


Abbildung 4.17: Darstellung der Aminosäurereste im NreA-Kristall mit wildtypischem Phänotyp, L38N, R57A und Q14A. Die Aminosäurereste nach Substitution gegen Alanin (Q14, R57), beziehungsweise Asparagin (L38) mit wildtypischem Phänotyp nach *narG-lip*-Messungen sind im NreA-Kristall in schwarz dargestellt. Unterstrichene Reste bilden keine Wasserstoffbrücken aus.

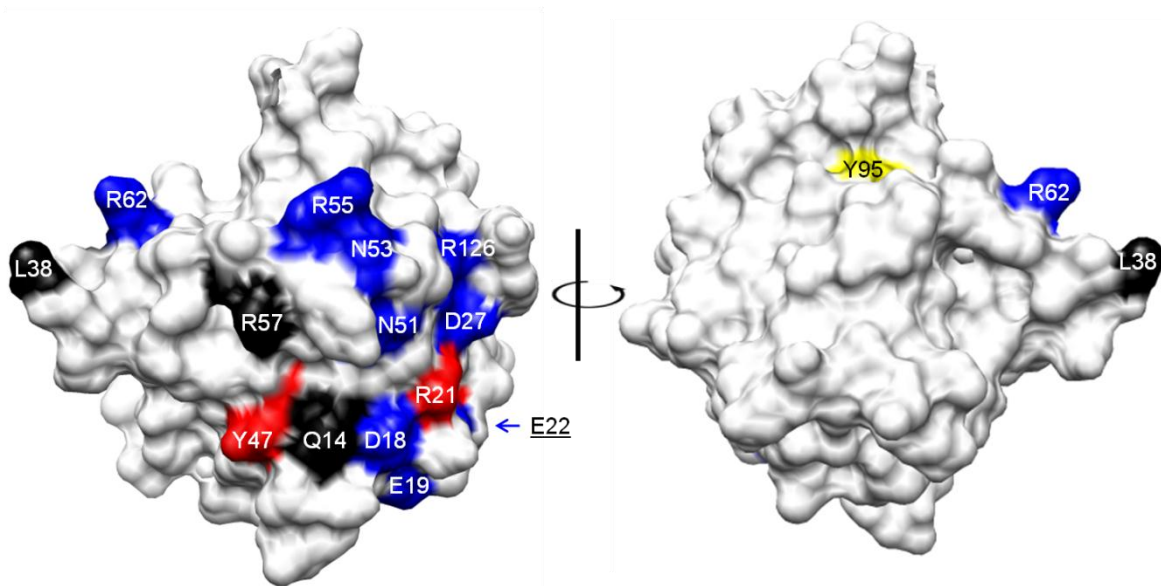


Abbildung 4.18: Oberflächendarstellung von NreA. Die NreA-Varianten mit oberflächenexponierten Resten sind eingefärbt. Wildtyp in schwarz, Δ NreA/ON-Phänotyp in blau und Δ NreABC/OFF-Phänotyp in rot. In gelb ist der „Deckel“ der Nitratbindetasche Y95 visualisiert.

Der nicht konservierte Rest L38 und der Rest R57 der wildtypischen NreA-Varianten NreA(L38N) und NreA(R57A) bilden keine intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen aus und sind zur Oberfläche exponiert (Abbildung 4.17, 4.18). Für den ebenfalls oberflächenexponierten Asparaginrest Q14 werden im Kristall drei mögliche Wasserstoffbrückenbindungen vom Amidstickstoff aus angezeigt. Diese wurden zum eigenen Rückgrat, zur Carboxylgruppe von D18 oder zum Rückgrat von S49 in β 2 gebildet. Die Substitutionen dieser drei Reste gegen Alanin hatten keinen Einfluss auf den wildtypischen Phänotyp. Ihre Funktion für NreA scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Reste R21, Y47 und L121 der Δ NreABC/OFF-Mutanten liegen auf der von der Nitratbindetasche gesehen gegenüberliegenden Seite des zentralen β -Faltblattes und ragen in den Raum zwischen der β -Faltblattstruktur und der α 1-Helix (Abbildung 4.19). Laut Kristallstruktur kann der oberflächenexponierte Rest R21 zum Rückgrat von F28 und zur Hydroxylgruppe von S49 Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (Abbildung 4.18, 4.20). Nach Substitution gegen Alanin bei der NreA(R21A)-Variante ist dies nicht mehr möglich.

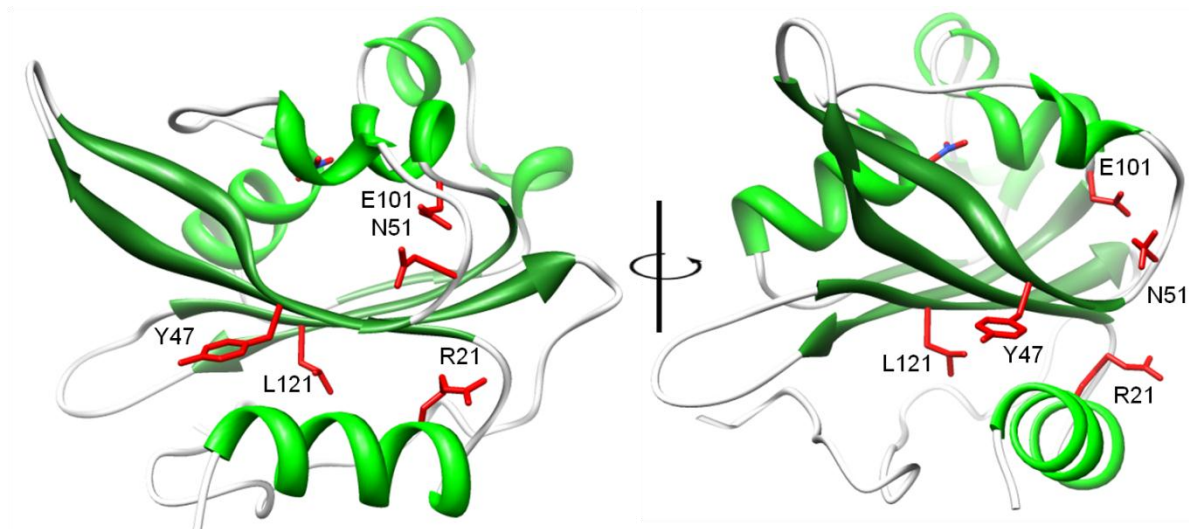


Abbildung 4.19: Darstellung der Aminosäurereste im NreA-Kristall mit Δ NreABC/OFF-Phänotyp, R21A, Y47A, N51A, E101A und L121S. Die Aminosäurereste nach Substitution gegen Alanin (R21, Y47, E101), beziehungsweise Serin (L121) mit Δ NreABC/OFF-Phänotyp nach *narG-lip*-Messungen sind im NreA-Kristall in rot dargestellt. Unterstrichene Reste bilden keine Wasserstoffbrücken aus.

Der Rest Y47 liegt am Rand der Fläche des zentralen β -Faltblatts. Bei der NreA(Y47A)-Variante verringert die Substitution von Tyrosin zu Alanin das eingenommene Volumen des Restes deutlich und die Polarität des Tyrosinrestes fällt weg. Der Funktionsverlust der NreA-Variante Y47A mit Δ NreABC/OFF-Phänotyp könnte zusätzlich mit der Oberflächenexposition von Y47 zusammenhängen.

Der Rest L121 liegt zentral in der Fläche des β -Faltblatts. Diese wird durch hydrophobe Reste geprägt, da L121 von den Resten I107, I109, L111, A29, I31, I109 und L123 umrundet wird. Eine Einfügung eines polaren Restes in diesen hydrophoben Bereich bei der NreA(L121S)-Variante geht mit einem Δ NreABC/OFF-Phänotyp einher.

Die Reste N51 und E101 befinden sich auf der anderen Seite des β -Faltblattes, also in der Nähe der Nitratbindetasche. Beide können Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, N51 über den Amidstickstoff zum Rückgrat von Y54 in der β_2 - α_2 -Schleife, E101 zum Rückgrat von I52 in der β_2 - α_3 -Schleife, sowie zur funktionellen Gruppe von R126 am Ende von β_5 . Die NreA(N51A)-Variante mit Δ NreABC/OFF-Phänotyp steht im Zusammenhang mit dem Wegfall der Wasserstoffbrückenbindungen vom Asparaginrest aus. Bei der NreA(N51D)-Variante ist die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen weiterhin möglich. Die Anwesenheit einer negativen Ladung korreliert mit dem Δ NreA/ON-Phänotyp. Zudem ist der Rest N51 oberflächenexponiert.

Bei der NreA(E101A)-Variante können genau wie bei der NreA(N51A)-Variante mit dem Alaninrest keine Wasserstoffbrückenbindungen mehr gebildet werden. Dies führt ebenfalls zu einem Δ NreABC/OFF-Phänotyp. Bei der NreA(E101Q)-Variante ist die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen weiterhin möglich. Die Amidgruppe macht den Unterschied

zwischen Glutamat und Glutamin aus und muss folglich den abweichenden Phänotyp hervorrufen und NreA im Inneren beeinflussen, da der Rest E101 in den Raum der Nitratbindetasche gerichtet ist (Abbildung 4.21).

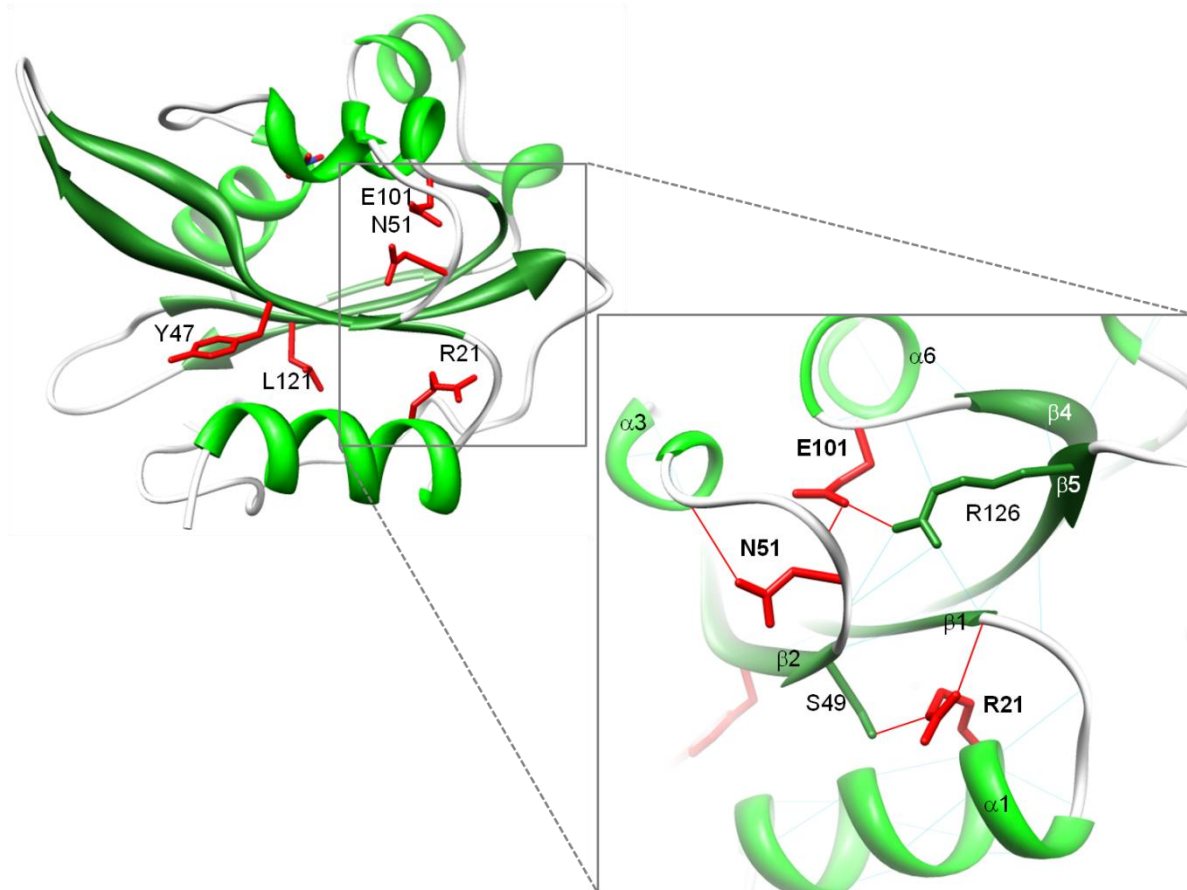


Abbildung 4.20: Darstellung der Aminosäurereste im NreA-Kristall mit Δ NreABC/OFF-Phänotyp, R21A, Y47A, N51A, E101A und L121S. Die Aminosäurereste nach Substitution in Alanin (R21, Y47, E101), beziehungsweise Serin (L121) mit Δ NreABC/OFF-Phänotyp nach *narG-lip*-Messungen sind im NreA-Kristall in rot dargestellt. In der Vergrößerung sind zusätzlich die von diesen Resten ausgehenden Wasserstoffbrückenbindungen angegeben. Unterstrichene Reste bilden keine Wasserstoffbrücken aus.

Der Rest L122 ist, ähnlich wie E101, in den Raum der Nitratbindetasche gerichtet (Abbildung 4.21), bildet aber keine Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die Substitution zu dem voluminösen Phenylalaninrest der NreA(L122F)-Variante geht einher mit dem abweichenden Phänotyp.

Der Rest F28 zeigt in den Raum der Nitratbindetasche (Abbildung 4.21), ähnlich wie E101 und L122. Weder der Phenylalaninrest F28 noch der substituierte Valinrest bilden Wasserstoffbrückenbindungen aus, sodass der Δ NreA/ON-Phänotyp von NreA(F28V) mit einer sterischen Veränderung einhergehen muss.

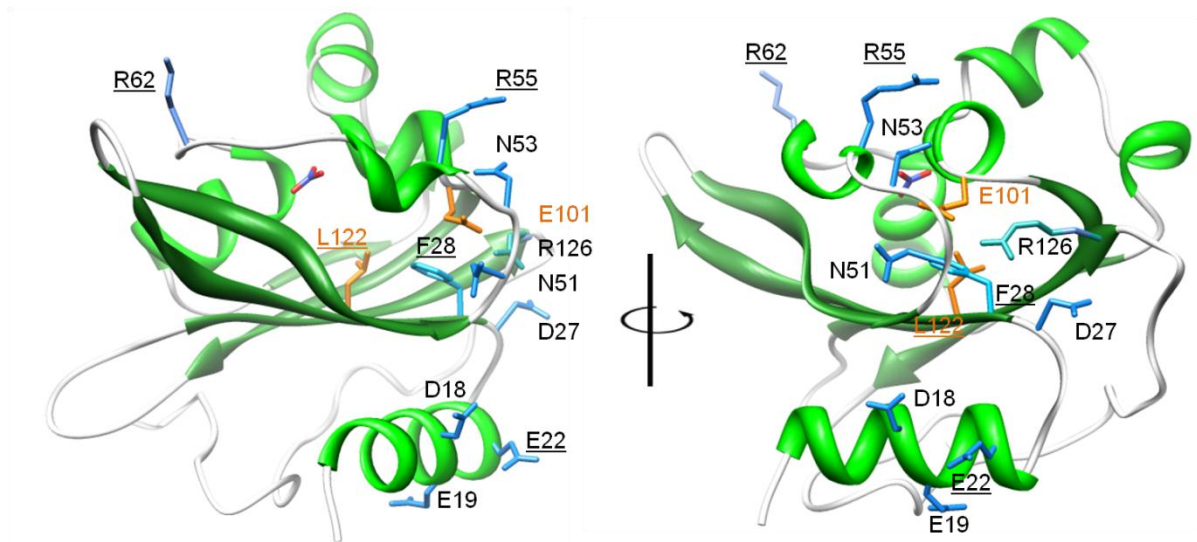


Abbildung 4.21: Darstellung der Aminosäurereste im NreA-Kristall mit Δ NreA/ON-Phänotyp, D18N-E19Q-E22Q-D27N, D27A, F28A, F28V, N51D N53D, R55A, R62A und R126A und abweichendem Phänotyp L122F und E101Q. Die Aminosäurereste mit Δ NreA/ON-Phänotyp nach *narG-lip*-Messungen sind im NreA-Kristall in blau und die mit abweichendem Phänotyp in orange dargestellt. Unterstrichene Reste bilden keine Wasserstoffbrücken aus.

Alle verbleibenden Reste, deren Substitution zu einem Δ NreA/ON-Phänotyp führte (Abbildung 4.21, 4.22), sind nach außen exponiert (Abbildung 4.18). Die Reste R62 und R55 sind besonders stark nach außen orientiert und bilden keine intramolekularen Wasserstoffbrücken. Durch die Substitution gegen Alanin könnten intermolekulare Wechselwirkungen betroffen sein, wodurch ein Δ NreA/ON-Phänotyp resultiert.

Der Rest D27 liegt in der α_1 - β_1 -Schleife und bildet eine Wasserstoffbrücke zu β_5 an das Rückgrat des Restes F28. In der NreA(D27A)-Mutante ist dies nicht mehr möglich. Ebenfalls wurde ein Δ NreA/ON-Phänotyp erhalten, wenn der D27-Rest, zusammen mit den Resten D18, E19 und E22 der α_1 -Helix zu den polaren Resten Asparagin und Glutamin in der Vierfachmutante NreA(D18N-E19Q-E22Q-D27N) substituiert wurde. Alle im Kristall angedeuteten Wasserstoffbrücken können theoretisch auch durch die Asparagin- und Glutaminreste ausgebildet werden, sodass der Δ NreA/ON-Phänotyp vielmehr mit dem Wegfall der vier negativen Ladungen in Zusammenhang stehen sollte.

Der Rest N53 bildet wie N51 Wasserstoffbrücken zum Rückgrat, über den Amidstickstoff zu S100 und über die Carbonylgruppe zu R55. Bei den Varianten NreA(N53D) und NreA(N51D) bleibt dies weiterhin möglich. Die Einfügung der negativen Reste an dieser Stelle im Protein geht in beiden Fällen mit dem Δ NreA/ON-Phänotyp einher.

Der Rest R126 bildet Wasserstoffbrücken jeweils zum Rückgrat von N51 in der β_2 - α_2 -Schleife, von D27 in der α_1 - β_1 -Schleife und von A102 in der α_6 - β_4 -Schleife. Durch Substitution zu Alanin fallen diese in der NreA(R126A)-Variante weg, woraus ein Δ NreA/ON-Phänotyp resultiert.

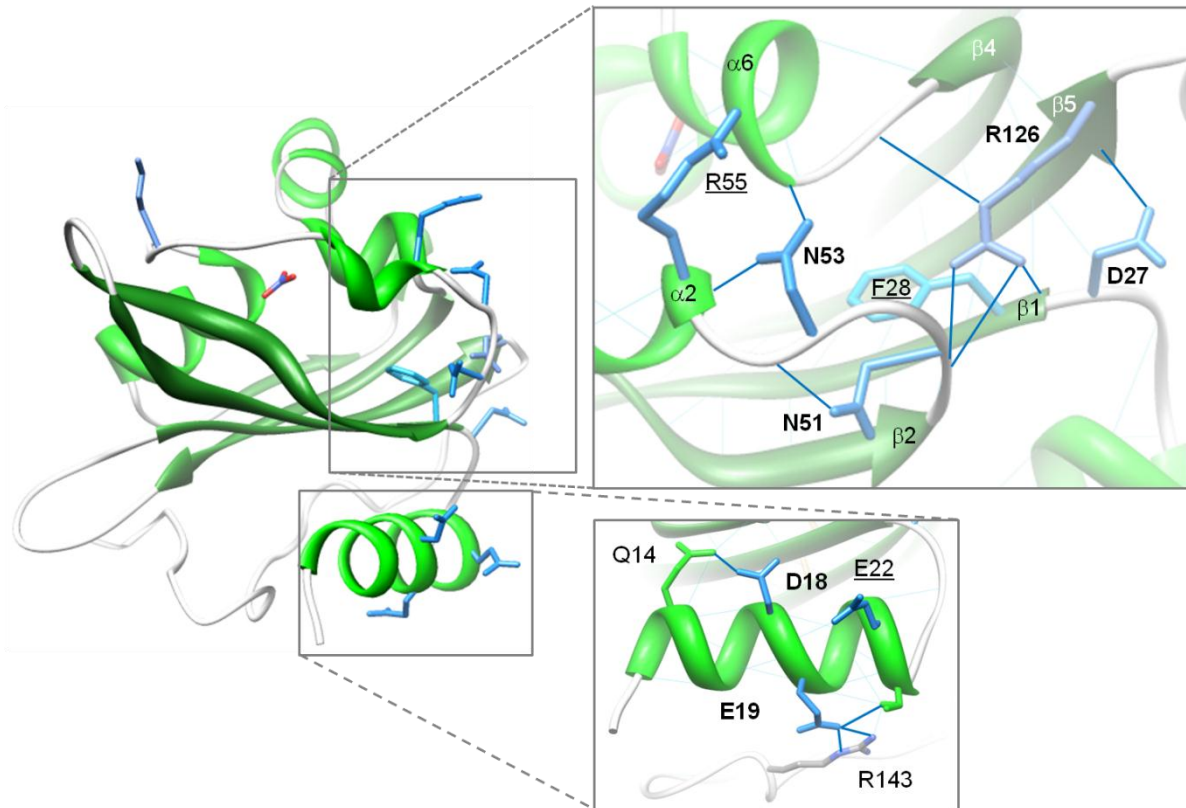


Abbildung 4.22: Darstellung der Aminosäurereste im NreA-Kristall mit Δ NreA/ON-Phänotyp, D18N-E19Q-E22Q-D27N, D27A, F28A, F28V, N51D N53D, R55A, R62A und R126A. Die Aminosäurereste mit Δ NreA/ON-Phänotyp nach *narG-lip*-Messungen sind im NreA-Kristall in blau dargestellt. In den Vergrößerungen sind zusätzlich die angegebenen Wasserstoffbrückenbindungen angezeigt. Unterstrichene Reste bilden keine Wasserstoffbrücken aus.

4.9 Proteinstabilität der mutierten Varianten von NreA *in vivo*

Ein veränderter Phänotyp einer NreA-Variante könnte auf einer funktionellen Veränderung basieren und auf veränderte intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen zurückzuführen sein (siehe oben). Ein weiterer Grund für den Phänotyp einer Proteinvariante könnte eine veränderte Proteinkonzentration der Variante *in vivo* sein. Um dies zu kontrollieren, wurden die NreA-Konzentrationen der einzelnen Varianten von *S. carnosus*-Zellen mit einer Western Blot Analyse überprüft. Dafür wurden die gleichen Stämme verwendet, mit denen auch die *narG-lip*-Expressionen durchgeführt wurden. Die Zellhomogenate wurden nach Auftrennung im SDS-Gel und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit polyklonalem Anti-NreA-Serum analysiert.

Die Intensität der Bande war für die meisten NreA-Varianten ähnlich und mit der des Wildtyps vergleichbar (Abbildung 4.23). Da die Gene von NreA und den NreA-Varianten alle auf Derivaten des gleichen Plasmids codiert vorliegen, ist davon auszugehen, dass sie alle mit der gleichen Intensität exprimiert werden. Die Unterschiede in den beobachteten Proteinkonzentrationen *in vivo* müssten demnach mit der Stabilität der NreA-Varianten korrelieren. Die Varianten NreA(R21A) und NreA(Y95A) zeigten etwas stärkere, die Varianten NreA(W45A), NreA(W45F) und NreA(R126A) etwas schwächere Banden im Vergleich zum

Wildtyp. Da NreA(R21A) und NreA(Y95A) in den Reporterstudien als Δ NreABC/OFF-Mutanten identifiziert wurden, könnte dies bedeuten, dass hier auch deren erhöhte Konzentration und nicht nur die strukturelle Veränderung alleine einen Einfluss haben. Die geringere Konzentration an NreA(R126A) könnte mit ihrem ON-Phänotyp korrelieren. NreA(W45F) zeigte trotz geringerer Konzentration einen wildtypischen Phänotyp. Die Variante NreA(F28A) war nicht nachweisbar und *in vivo* offenbar instabil.

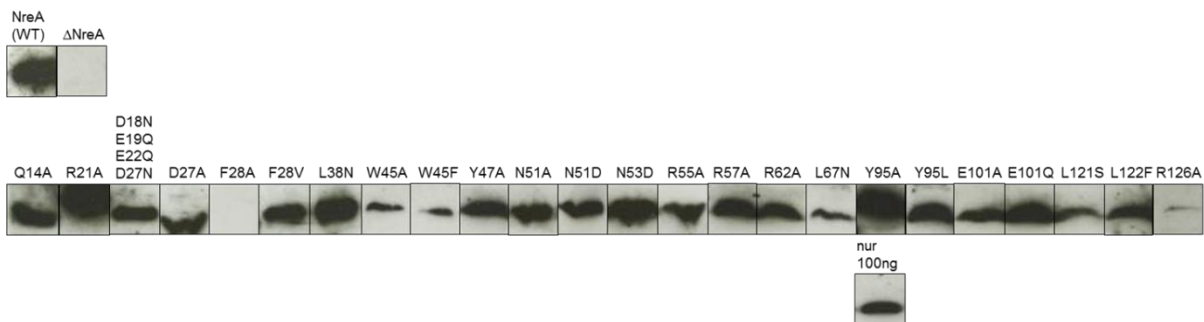


Abbildung 4.23: Nachweis der Bildung von NreA und NreA-Varianten in *S. carnosus* mittels Western Blot Analyse. Stämme von *S. carnosus* m1 mit pMW1040, pMW1393 und pMW1040-Derivaten wurden nach aerober Zucht mit Nitrat (10 mM, 3 ½ h) mittels French Press aufgeschlossen. Nach Proteinauftrennung per SDS-PAGE wurde auf die Bildung von NreA und NreA-Varianten durch Western Blot Analyse untersucht. Verwendet wurde spezifisches, polyklonales Anti-NreA-Serum. Gezeigt ist die NreA-Bande bei etwa 20 kDa nach Auftragung von 800 µg Gesamtprotein.

4.10 Iodidabhängigkeit der NreA-Funktion *in vivo*: *narG-lip*-Expressionen mit Iodid

Die Kristallstruktur von NreA wurde mit gebundenem Nitrat und gebundenem Iodid aufgelöst. Da sie eine ähnliche Größe aufweisen, finden beide Ionen in der Bindetasche Platz. Es wurde daher untersucht, ob Iodid *in vivo* in Lipaseexpressionsstudien einen ähnlichen Effekt hervorruft, wie Nitrat und physiologische Relevanz besitzt. Zudem wurde getestet, ob das Kation des Nitratsalzes einen Einfluss besitzt und ob Nitrit, als ähnlich großes Anion und im Nitratstoffwechsel involviert, ebenfalls einen Effekt aufweist (Abbildung 4.24).

Untersucht wurden drei Referenzstämme basierend auf der Δ *nreABC*-Mutante m1, die mit pMW1001 (*p-*), pMW1040 (*pnreABC*) und pMW1393 (*pnreBC*) komplementiert wurden (vgl. Abschnitt 4.5). Die Phänotypen waren entsprechend Δ NreABC, Wildtyp (WT) und Δ NreA. Gemessen wurde unter Anaerobiose in mBM-Medium, welches optional mit NaNO₃, KNO₃, NaI oder NaNO₂ (je 10 mM) versetzt wurde.

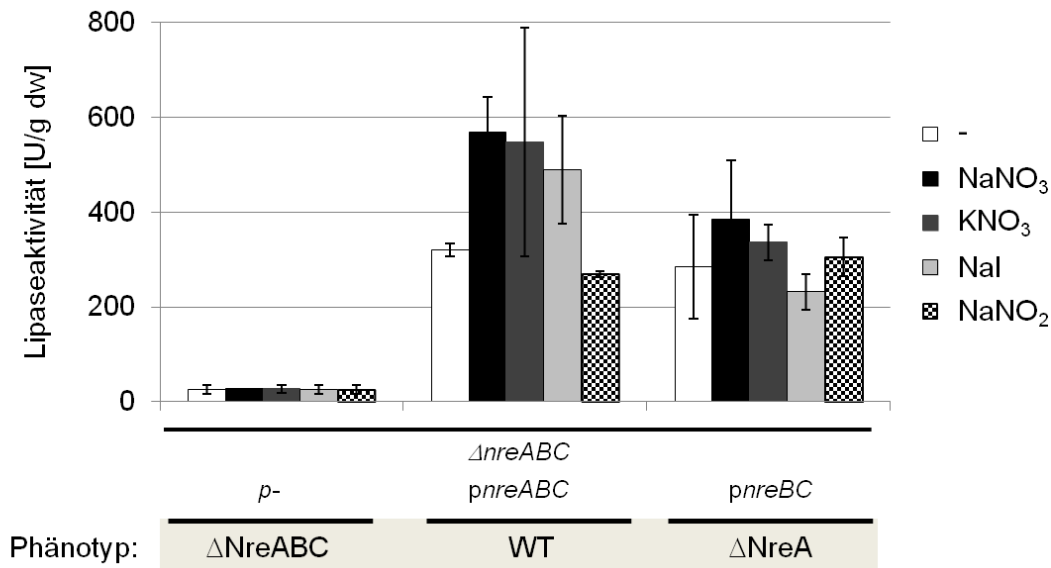


Abbildung 4.24: Lipaseaktivität (*narG-lip* Expression) nach anaerober Stimulierung der *narG-lip* Expression durch Nitrat, Iodid und Nitrit. Spezifische Lipaseaktivitäten unter anaeroben Bedingungen sind dargestellt. Die $\Delta nreABC$ -Mutante m1 wurde mit folgenden Plasmiden komplementiert: pMW1001 (*p-*), pMW1393 (*pnreBC*) und pMW1040 (*pnreABC*). Der Phänotyp ist grau hinterlegt. Weiße Balken geben Zuchten in mBM-Medium an. Schwarze Balken geben Zuchten in mBM-Medium mit Natriumnitrat (NaNO_3), dunkelgraue Balken in mBM-Medium mit Kaliumnitrat (KNO_3), hellgraue Balken in mBM-Medium mit Natriumjodid (NaI) und karierte Balken in mBM-Medium mit Natriumnitrit (NaNO_2) an. Die Salze wurden in 10 mM Endkonzentration zugesetzt.

Beim Wildtyp wurde die bereits bekannte Nitratstimulierung beobachtet, unabhängig davon, ob es sich um ein Natrium- oder Kaliumsalz handelte. Nitritzugabe hatte keine positive Stimulierung zur Folge, obwohl es strukturelle Ähnlichkeit zu Nitrat aufweist und als Metabolit der Nitratatmung relevant sein könnte (Fedtke *et al.*, 2002). Die Präsenz von Iodid bewirkte einen ähnlichen Effekt wie Nitrat, auch wenn dieser schwächer ausfiel (Faktor 1,5, statt 1,8). Die $\Delta NreABC$ und $\Delta NreA$ -Mutanten wiesen, wie bereits zuvor beobachtet, einen konstant inaktiven, beziehungsweise deregulierten Phänotyp auf.

4.11 Protein-Protein-Interaktionen innerhalb von NreABC

4.11.1 Beeinflussung der Regulation der Zielgene von NreBC durch NreA und Nitrat

Wie die *narG-lip* Expressionsstudien zeigten, hat NreA einen Einfluss auf die Regulation des anaeroben Nitratstoffwechsels durch NreBC in Abhängigkeit von Nitrat. Da vorausgegangene Studien keine NreA-Bindung an die Promotor-DNA von *nirR*, *narG* und *narT* zeigten (Reinhart, 2010; Nilkens *et al.*, 2013), wurde überprüft, in wieweit NreA mit NreB und/oder mit NreC auf Proteinebene interagiert und ob es dabei einen Einfluss von Nitrat gibt.

Eine direkte Protein-Protein-Interaktion ist immer dann nötig, wenn Signale übertragen oder regulierende Funktionen ausgeübt werden sollen. Bei der Signaltransduktion von NreB zu NreC ist nur auf diese Weise die Übertragung der Phosphorylgruppe möglich. Die dafür nötigen Wechselwirkungen müssen ausreichend stabil, aber reversibel sein. Deshalb

beruhen sie auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten beider Proteine (Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen).

Das NreABC-System wurde *in vivo* (BACTH, Cross-Linkings) und *in vitro* (Cross-Linkings) hinsichtlich der auftretenden Protein-Protein-Interaktionen untersucht, mit speziellem Fokus auf die Interaktion von NreA mit NreB, beziehungsweise NreC.

4.11.2 Anaerobe Interaktionsmessungen von NreABC

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen eignet sich das Bacterial Two-Hybrid (BACTH)-Systems (Karimova *et al.*, 1998). Das Prinzip basiert auf der Refunktionalisierung (=Wiederherstellung) der Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis* in dem *cya*(Adenylatzyklase)-negativen Stamm von *E. coli* (BTH101). Die Aktivität der Adenylatzyklase ist vorhanden, wenn deren Domänen T25 und T18 in einem Transkript vorliegen. Bei räumlicher Trennung von T25 und T18 ist die Adenylatzyklase inaktiv. Nach Fusionierung der beiden Domänen an zwei Proteine, die miteinander in Kontakt sind, kann die Aktivität der Adenylatzyklase durch Zusammenbringung der beiden Untereinheiten wieder hergestellt werden. Aktive Adenylatzyklase kann mittels β -Galaktosidasemessungen über das chromogene Katalyseprodukt *o*-Nitrophenol quantifiziert werden. Dies erlaubt Rückschlüsse auf vorhandene oder nicht vorhandene Interaktionen der Fusionsproteine.

Als Positivkontrolle diente die Fusionierung von T25 und T18 an zwei Leucinzipper, welche stark miteinander interagieren (Karimova *et al.*, 1998). Folglich führte dies zu hohen β -Galaktosidasewerten in der nitratfreien Zucht (weiße Balken), da T25 und T18 in räumliche Nähe zueinander gebracht werden und so als aktive Adenylatzyklase wirken können. Als negative Kontrolle wurde die β -Galaktosidaseexpression im Falle der Verwendung zweier garantiert nicht interagierender Proteine gemessen, hier Zip und NreA. Die ermittelte β -Galaktosidaseexpression betrug 220 MU und gibt die Schwelle des Hintergrundniveaus an. Alle Werte, die sichtbar über dem Schwellenwert lagen, zeigten eine Protein-Protein-Interaktion an. Bei Zugabe von Natriumnitrat (schwarze Balken) erhielt man bei beiden Kontrollen unerheblich niedrigere β -Galaktosidasewerte (Abbildung 4.25).

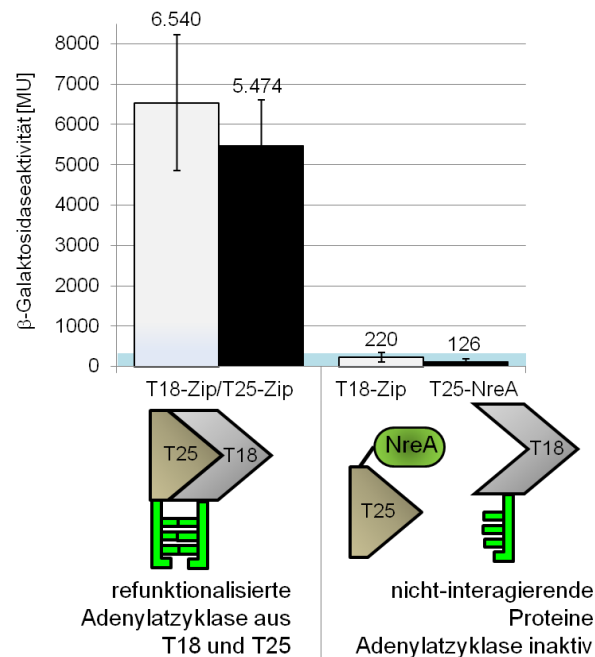


Abbildung 4.25: Kontrollen für die Protein-Interaktionsstudien mit dem Bacterial Two-Hybrid System (BACTH) unter Anaerobiose. Positive Interaktion wird durch refunktionalisierte Adenylatzyklase aus den Domänen T18 und T25 erreicht, hier durch Fusionen mit stark interagierenden Leucinzippern (Zip) zu T25-Zip und T18-Zip. Zur Festlegung der Hintergrundexpression von nicht-interagierenden Proteinen wurde das Expressionslevel des Paares T25-NreA und T18-zip verwendet und als Schwellenwert festgelegt. Zur Quantifizierung der Proteininteraktion wurde die β -Galaktosidaseaktivität bei einer OD_{570} von 0,25 – 0,5 ermittelt und in [MU] angegeben. Weiße Balken zeigen β -Galaktosidaseaktivität nach nitratfreier, anaerober Zucht (30 °C, LB mit IPTG (0,5 mM), DMSO (20 mM), Ampicillin (10 μ g/ml), Kanamycin (50 μ g/ml)) an und schwarze Balken mit zusätzlich NaNO_3 (10 mM). Die Fläche unterhalb des Schwellenwertes ist hellblau hinterlegt.

4.11.3 Homologe Interaktionen von NreA, NreB und NreC unter Anaerobiose: Effekt von Nitrat

Interaktionen von NreA, NreB und NreC mit sich selbst wurden für vier theoretisch mögliche Kombinationen der BACTH-Konstrukte gemessen. In Abbildung 4.26 sind repräsentativ die Ergebnisse von jeweils zwei Möglichkeiten dargestellt. Es wurden folgende Kombinationen gewählt:

- NreA-T25, NreB-T25 oder NreC-T25 mit T18-NreA, T18-NreB oder T18-NreC
- T25-NreA, T25-NreB oder T25-NreC mit NreA-T18, NreB-T18 oder NreC-T18

Die β -Galaktosidaseaktivitäten aller Messungen ohne Nitrat lagen weit über dem Schwellenwert der Negativkontrolle (T18-zip mit T25-NreA).

Die Werte der NreB/NreB-Interaktion erreichten 60% der Positivkontrolle, die der NreC/NreC-Interaktion im Mittel 10% und die der NreA/NreA-Interaktion im Mittel 14%. Die beobachteten Interaktionen korrelieren bei NreB mit der bereits nachgewiesenen dimeren Form (Müllner, 2008). Bei NreC und NreA handelt es sich vermutlich ebenfalls um Dimere.

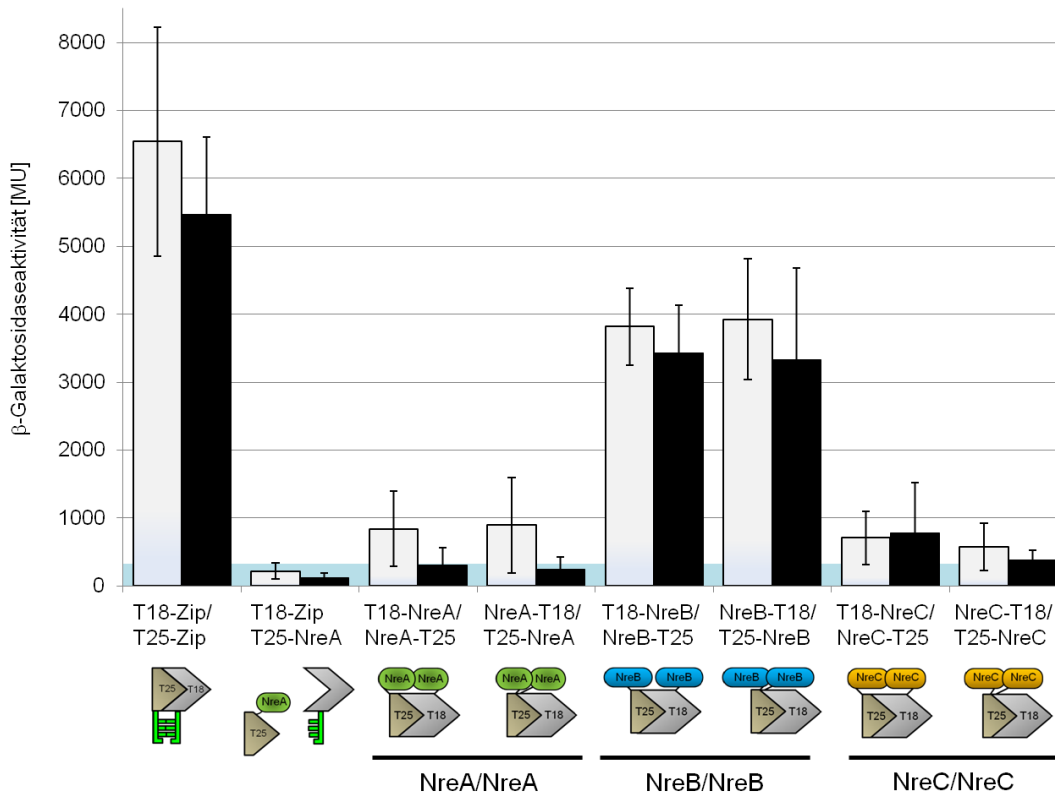


Abbildung 4.26: Nitratabhängige, homologe Interaktionsstudien von NreA, NreB und NreC mit dem Bacterial Two-Hybrid System (BACTH) unter Anaerobiose. Der *cya*-negative *E. coli* Stamm BTH101 wurde mit einem Plasmidpaar zur Rekonstitution der Adenylatzyklase cotransformiert: ein Plasmid kodierend für ein Fusionsprotein von NreA, NreB oder NreC mit der T25-Domäne und ein Plasmid kodierend für ein Fusionsprotein von NreA, NreB oder NreC mit der T18-Domäne. Folgende Kombinationen der Fusionsproteine sind gezeigt: T18-NreA/NreA-T25, NreA-T18/T25-NreA, T18-NreB/NreB-T25, NreB-T18/T25-NreB, T18-NreC/NreC-T25 und NreC-T18/T25-NreC. Das Maß ihrer Proteininteraktion ist die gemessene β -Galaktosidaseaktivität [MU]. Als positive Kontrolle diente das interagierende Paar T25-Zip/T18-Zip und als negative Kontrolle das nicht-interagierende Paar T25-NreA mit T18-Zip. Die hellblau hinterlegte Fläche markiert das Level der Hintergrundexpression. Helle Balken geben nitratfreie und schwarze Balken nitrathaltige (10 mM) Zuchten an.

Die Zugabe von Nitrat verringerte die Werte der NreB/NreB-Interaktion nur geringfügig, um 10 - 15%, was auch bei der Positivkontrolle (16%) beobachtet wurde. Dies scheint mit einem Salzeffekt oder Ähnlichem zu korrelieren. Bei den NreC/NreC-Interaktionen äußerte sich dies für die verschiedenen Konstrukte unterschiedlich stark, da entweder keine Abnahme, oder eine um 34% zu verzeichnen war. Die erhaltenen Werte lagen aber alle deutlich über dem Schwellenwert. Demnach bildeten NreB und NreC unter anaeroben Bedingungen Homodimere, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Nitrat.

Im Gegensatz dazu kann man einen deutlichen Nitrategieffekt bei den NreA/NreA-Interaktionen erkennen. Bei Nitratwesenheit nahmen die Werte je nach Konstrukt deutlich um 64 - 73% ab und befanden sich mit Nitrat nur noch knapp über dem Schwellenwert. Den Messungen zufolge waren die NreA-Homodimere bei Nitratwesenheit fast völlig verschwunden.

4.11.4 Heterologe Interaktionen von NreA, NreB und NreC unter Anaerobiose: Effekt von Nitrat

Heterologe Interaktionen von NreA mit NreB, NreB mit NreC und NreC mit NreA wurden jeweils in allen acht möglichen Kombinationen unter anaeroben Bedingungen mit und ohne Nitrat analysiert. Abbildung 4.27 zeigt jeweils zwei stellvertretende Kombinationen. Es wurden folgende Kombinationen gewählt:

- NreA-T25 mit T18-NreB
- T25-NreA mit NreB-T18
- NreC-T25 mit T18-NreB
- T25-NreC mit NreB-T18
- NreA-T25 mit T18-NreC
- T25-NreA mit NreC-T18

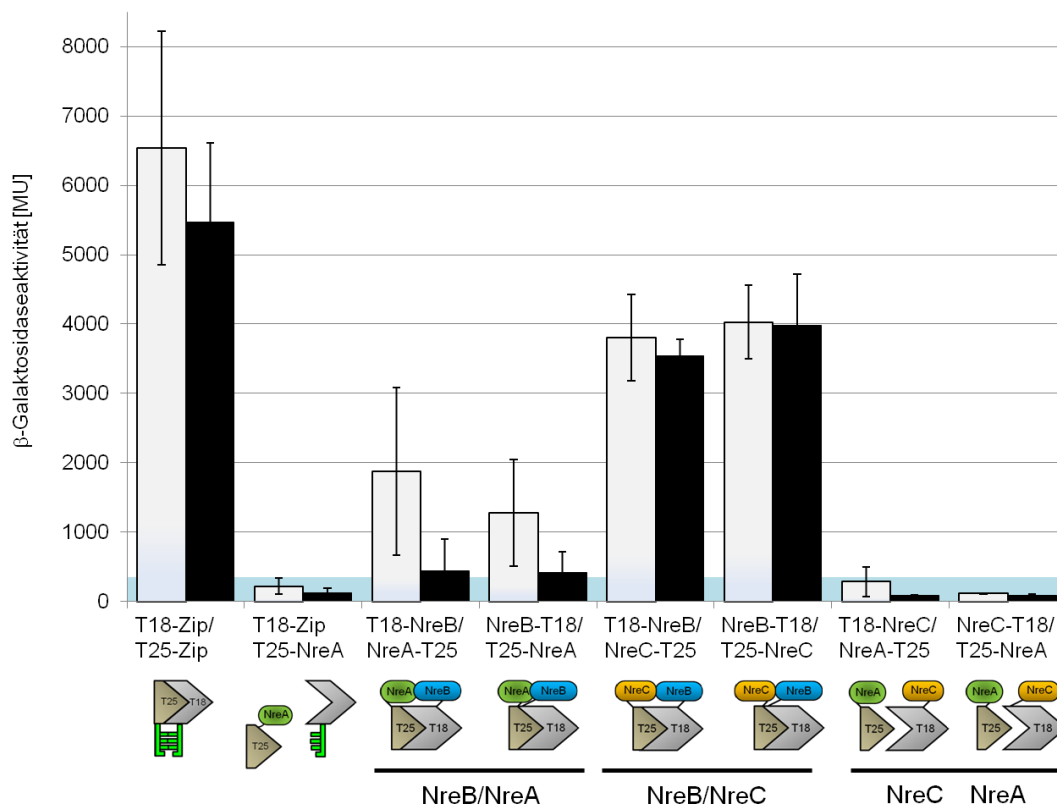


Abbildung 4.27: Nitratabhängige, heterologe Interaktionsstudien von NreA, NreB und NreC mit dem Bacterial Two-Hybrid System (BACTH) unter Anaerobiose. Der *cya*-negative *E. coli* Stamm BTH101 wurde mit einem Plasmidpaar zur Rekonstitution der Adenylatzyklase cotransformiert: ein Plasmid kodierend für ein Fusionsprotein von NreA, NreB oder NreC mit der T25-Domäne und ein Plasmid kodierend für ein Fusionsprotein von NreA, NreB oder NreC mit der T18-Domäne. Folgende Kombinationen der Fusionsproteine sind gezeigt: T18-NreB/NreA-T25, NreB-T18/T25-NreA, T18-NreB/NreC-T25, NreB-T18/T25-NreC, T18-NreC/NreA-T25 und NreC-T18/T25-NreA. Das Maß ihrer Proteininteraktion ist die gemessene β -Galaktosidaseaktivität [MU]. Als positive Kontrolle diente das interagierende Paar T25-Zip/T18-Zip und als negative Kontrolle das nicht-interagierende Paar T25-NreA mit T18-Zip. Die hellblau hinterlegte Fläche markiert das Level der Hintergrundexpression. Helle Balken geben nitratfreie und schwarze Balken nitrathaltige (10 mM) Zuchten an.

Bei den nitratfreien, heterologen BACTH-Experimenten lagen die β -Galaktosidaseaktivitäten von NreB/NreC und NreB/NreA deutlich über dem Schwellenwert der Negativkontrolle (T18-Zip mit T25-NreA). Die Werte der NreB/NreC-Interaktion erreichten im Mittel 61% der Positivkontrolle und die der NreB/NreA-Interaktion im Mittel 24%. Die Interaktionsmessungen mit den Kombinationen von NreC und NreA lagen dagegen im Bereich der Negativkontrolle. Die beobachteten Interaktionen von NreB mit NreC korrelieren mit ihrer Funktion als Zweikomponentensystem, da bei der Übertragung der Phosphorylgruppe eine Protein-Protein-Interaktion essentiell ist. Die Interaktion von NreB mit NreA korreliert mit der Vorstellung, dass NreA einen negativen Regulator von NreB darstellt. Die Anwesenheit von Nitrat beeinflusst die Werte der NreB/NreC-Interaktion um weniger als 10% im Vergleich zur Positivkontrolle (16%). Bei den Werten der NreB/NreA-Interaktion verringerte sich die heterologe Interaktion durch Nitrat – je nach Konstrukt – sehr stark um 68 - 76 %. Die Interaktionsmessungen von NreC und NreA verblieben mit Nitrat unverändert unter dem Schwellenwert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass NreA, NreB und NreC jeweils mit sich selbst interagieren. Dabei liegen NreA und NreC vermutlich, wie bereits von NreB bekannt, als Homodimere vor. NreA ist dabei scheinbar ein nitratsensitives Dimer, welches in Gegenwart des Anions dissoziiert.

Im NreABC-System wechselwirkt NreB mit NreC und NreA mit NreB. Zwischen NreA und NreC gibt es keine Interaktion. Einen negativen Nitateffekt kann man bei der NreA/NreB-Interaktion beobachten – die Gegenwart von Nitrat führt auch hier zur Verringerung der Wechselwirkung der beiden Proteine.

Zur Überprüfung des Einflusses der Mutation bei der NreA-Variante NreA(Y95A) auf die NreA/NreA-, beziehungsweise NreB/NreA-Interaktion wurden die BACTH-Interaktionsmessungen nach Einfügung der Mutation wiederholt. In Abbildung 4.28 sind die Ergebnisse folgender Kombinationen vergleichend dargestellt:

- T18-NreA mit NreA-T25
- T18-NreA(Y95A) mit NreA(Y95A)-T25
- T18-NreB mit NreA-T25
- T18-NreB mit NreA(Y95A)-T25

Die NreA/NreA-, sowie NreA/NreB-Interaktionen mit und ohne Nitrat unterscheiden sich bei der NreA(Y95A)-Variante nicht von der des Wildtyps.

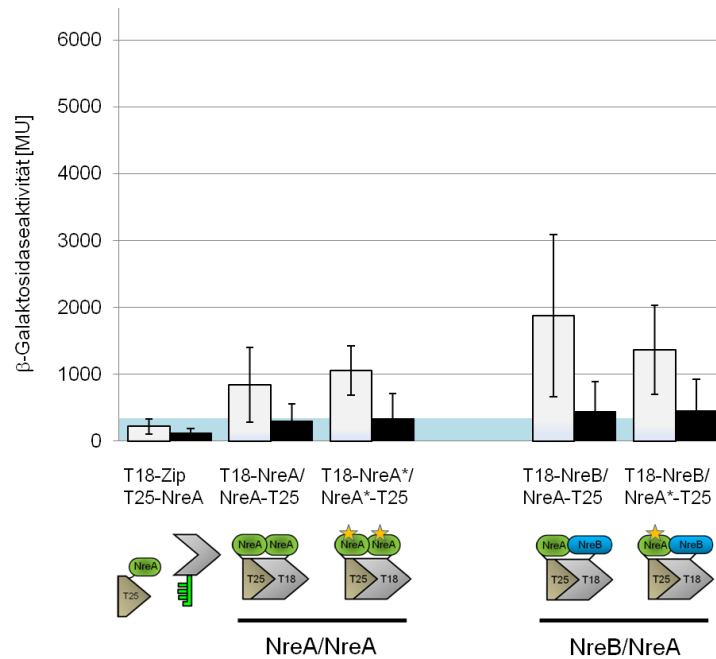


Abbildung 4.28: Einfluss von Y95A in NreA auf die Interaktionen im BACTH-System. Neben der Negativkontrolle und den NreA/NreA-, sowie NreB/NreA-Interaktionen aus den Abbildungen 4.26 und 4.27 (links) sind die analog durchgeführten BACTH-Messungen mit der NreA(Y95A)-Mutante gezeigt (rechts).

4.12 Größenbestimmung durch Gelfiltration

In den Kristallstrukturanalysen liegt NreA sowohl mit Iodid als auch mit Nitrat als Ligand in monomerer Form vor. In den BACTH-Experimenten beobachtete man mit Nitrat monomeres NreA und ohne Nitrat NreA in einer Form, die mit sich selbst Wechselwirkungen eingeht (Dimer oder höhere Oligomere). Daher sollten mittels Gelfiltrationsanalysen weitere Hinweise zum Oligomerisierungsgrad von NreA ermittelt werden.

Gelfiltration ist eine chromatographische Methode, bei der Moleküle aufgrund ihrer Größe, beziehungsweise ihres Molekülradius in Lösung über eine Trennsäule mit einem quervernetzten Polymerharz aufgetrennt werden. Kleine und große Moleküle können voneinander getrennt werden, da große Moleküle nicht in die Poren der stationären Phase eindringen können. Sie eluieren daher schneller als kleine Moleküle. Diese können eindiffundieren und ihnen steht ein größeres Flüssigkeitsvolumen zur Verfügung. Sie benötigen mehr Zeit die Säule zu durchlaufen, werden also von der stationären Phase länger zurückgehalten. Die stationäre Phase besteht meist aus granulären, porösen Polymeren. Die verwendete Superdex75-Säule besitzt eine stationäre Phase mit einer vernetzten Agarose-Dextranstruktur.

Anhand der mit Hilfe bekannter Proteine erstellten Eichgerade wurde NreA als Dimer identifiziert (Abbildung 4.29). Der aufgrund des Experiments berechnete Wert von 39,7 kDa entspricht sehr genau dem theoretischen Dimer-Molekulargewicht von 39,8 kDa. Aufgrund der Streuung der Werte der Eichproteine ergibt sich jedoch, bei Weglassen des Wertes für Lysozym, eine differierende Eichgerade. Unter Verwendung dieser alternativen Eichgerade

ergibt sich ein rechnerisches Molekulargewicht für NreA von 22 kDa. Dieser Wert entspricht eher der monomeren Form von NreA. Dies korreliert auch mit der im Vergleich zur 29 kDa großen Carboanhydrase geringeren Retentionszeit. Nitrat hatte keinen Einfluss auf die Mobilität von NreA in der Gelfiltration.

Anhand der Gelfiltrationsexperimente lässt sich der Oligomerisierungsgrad von NreA nicht eindeutig bestimmen. In der Folge sind die Ergebnisse Gelfiltrationsexperimente nicht konform mit den Daten der Protein-Protein-Interaktionen, die mittels BACTH-Messungen erhalten wurden. Es lässt sich jedoch feststellen, dass NreA lediglich in monomerer oder dimerer Form eluiert und keine höheren Aggregate zu verzeichnen waren.

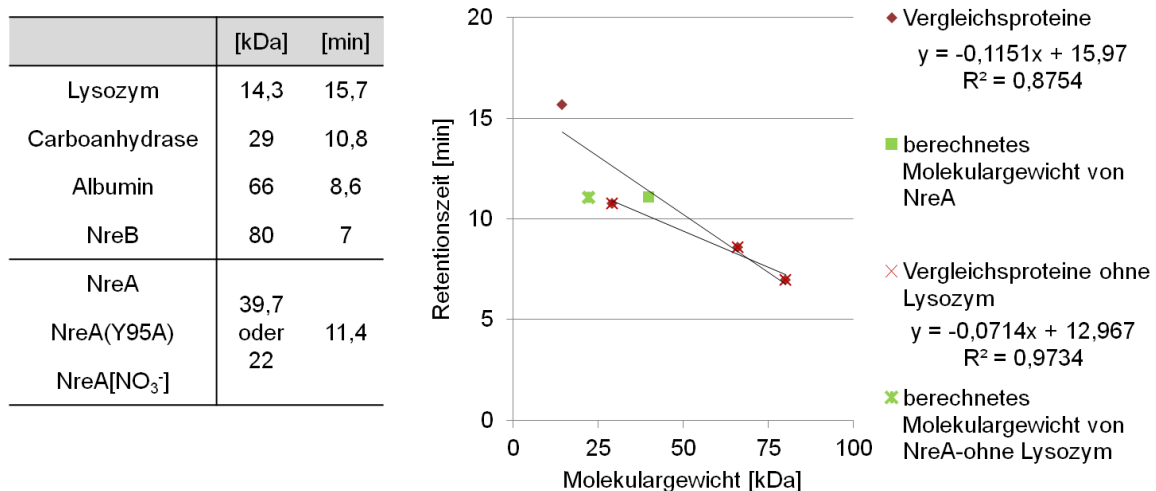


Abbildung 4.29: Gelfiltration von NreA. In der Tabelle sind die Molekulargewichte und ermittelten Retentionszeiten in den Gelfiltrationsexperimenten aufgelistet. Die Eichgerade der Vergleichsproteine wurde einmal mit Lysozym erstellt und einmal ohne Lysozym. Anhand der Eichgeraden wurde das Molekulargewicht von NreA ermittelt.

4.13 *In vitro* Cross-Linking Experimente mit NreA und NreB

Eine wichtige Frage der vorliegenden Arbeit war, ob NreA mit NreB interagiert. Daher wurde sowohl mit *in vitro*- als auch mit *in vivo* Cross-Linking Experimenten nochmals speziell die Interaktion zwischen NreA und NreB untersucht.

Bei Cross-Linking Experimenten verwendet man Reagenzien, die Proteine chemisch miteinander verknüpfen, indem sie mit deren Aminosäureresten unter Ausbildung kovalenter Bindungen reagieren. Hier wurde der sehr kurze Cross-Linker Formaldehyd (FA) verwendet, der eine Länge von 2,3 - 2,7 Å hat (Klockenbusch und Kast, 2010). Formaldehyd kann die Zellmembran passieren und wurde daher nicht nur für die *in vitro*-, sondern auch für die *in vivo*- Versuche verwendet. Der Aldehyd reagiert dabei mit Amin- und Amidgruppen von Proteinen und stellt eine Verknüpfung her. Diese Bindungsbildung zwischen FA und Protein ist jedoch reversibel und kann durch Erhitzen der Probe auf 99 °C wieder rückgängig gemacht werden (Klockenbusch und Kast, 2010).

Tabelle 4.5: Theoretische Molekulargewichte von NreA, NreB und NreA/NreB in verschiedenen Oligomerisierungszuständen. NreX entspricht NreA oder NreB.

Oligomerisierung	NreA [kDa]	NreB [kDa]	NreA/NreB [kDa]
Monomer (NreX ₁)	19,9	41	60,9
Dimer (NreX ₂)	39,9	82	121,8
Trimer (NreX ₃)	59,7	123	182,7
Tetramer (NreX ₄)	79,6	164	243,6

Zur Analyse der Interaktionen von NreA und NreB wurde für die *in vitro* Cross-Linking Experimente aerob ohne und mit Nitrat aufgereinigtes His-NreA, beziehungsweise His-NreA[NO₃] (pQE31-nreA) aus *E. coli* verwendet, sowie aerob, beziehungsweise anaerob präpariertes NreB-His (pCQE1-nreB) aus *S. carnosus*. Nach Dialyse zur Entfernung von Imidazol wurde die Probe unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit FA (1% v/v) bei 26 °C inkubiert. Die Reaktionszeit betrug eine halbe Stunde um unspezifische Aggregation zu minimieren aber eine ausreichende Menge an analysierbarem Reaktionsprodukt zu erhalten. Die Proben wurden mittels denaturierender SDS-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. His-NreA besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 19,9 kDa und NreB-His von 41 kDa. In Tabelle 4.5 sind die theoretischen Molekulargewichte von NreA-, NreB- und NreA/NreB-Oligomerisierungsmöglichkeiten aufgelistet.

Nach Anfärben der SDS-Gele mit Bromphenolblau-haltiger Färbelösung und anschließender Entfärbung konnte man die Proteinbanden deutlich erkennen (Abbildung 4.30).

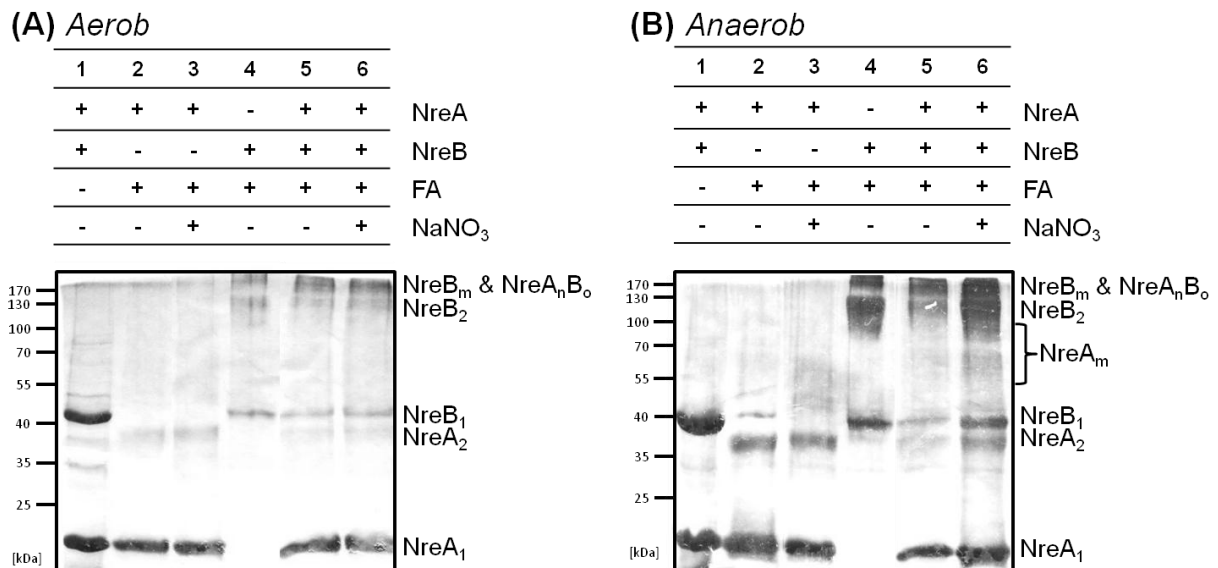


Abbildung 4.30: Aerobes (A) und anaerobes (B) *in vitro* Cross-Linking von NreA und NreB. Für die *in vitro* Cross-Linking Experimente wurden aerob, ohne beziehungsweise mit Nitrat aufgereinigtes His-NreA, bzw. His-NreA[NO₃] (pQE31-nreA) aus *E. coli* und aerob, beziehungsweise anaerob präpariertes NreB-His (pCQE1-nreB) aus *S. carnosus* verwendet, nachdem durch Dialyse Imidazol entfernt wurde. Pro Reaktionsansatz (20 µl) wurden je 10 µg Protein eingesetzt. Das chemische Cross-Linking erfolgte aerob, beziehungsweise anaerob durch 1% (v/v) Formaldehyd (30 Minuten, 26 °C). Analysiert wurden die Proben mittels Bromphenolblau-Färbung nach Auftrennung im 12%-Acrylamid-SDS-Gel.

In allen Spuren mit NreA ist eine Proteinbande von monomerem NreA vorhanden (NreA₁). Die Intensität der NreA-Monomerbanden war in allen Ansätzen mit Formaldehyd (Spuren 2, 3, 5, 6) leicht schwächer als ohne Formaldehyd (Spur 1). Zusätzlich ist eine Bande erkennbar, die der dimeren Form entspricht (NreA₂), wobei deren Intensität mit und ohne Nitrat vergleichbar ist (Spuren 2, 3). Trimeres oder tetrameres NreA (NreA_{3,4}) ist sowohl unter aeroben (Abbildung 4.30A) als auch unter anaeroben Bedingungen (Abbildung 4.30B) nicht oder nur schwach erkennbar.

In allen Ansätzen mit NreB ist eine Bande vorhanden, die monomerem NreB entspricht (NreB₁). In Anwesenheit von FA nimmt die Intensität dieser Bande stark ab (Spur 4 - 6). Dafür treten zwei weitere Banden auf, wobei die eine einem dimeren oder trimeren NreB (NreB₂) und die andere einer höher oligomeren Form entspricht. Bei letzteren handelt es sich möglicherweise um eine tetramere Form (NreB₄). Aufgrund vorangegangener Experimente (Müllner, 2008) ist anzunehmen, dass es sich bei der mit NreB₂ bezeichneten Bande um dimeres NreB handelt. Die Intensität von NreB₂ ist bei NreA-Anwesenheit etwas schwächer (Spur 5) als bei alleiniger NreB-Anwesenheit (Spur 4) oder gleichzeitiger Anwesenheit von NreA und Nitrat (Spur 6). Bei den Banden der oligomeren NreB-Formen kann man keine deutlichen Unterschiede in Abhängigkeit von NreA und Nitrat wahrnehmen. Dies trifft sowohl für aerobe (Abbildung 4.30A) als auch für anaerobe Bedingungen (Abbildung 4.30B) zu.

Unabhängig von Sauerstoff und Nitrat waren demnach NreA und NreB in monomerer und dimerer Form vorhanden, beziehungsweise wurde unter den Cross-Linking-Bedingungen nur ein Teil des Dimers kovalent verknüpft. Daneben existierten jeweils oligomere Formen.

Bei gleichzeitiger NreA- und NreB-Anwesenheit (Spuren 5, 6) war die Intensität der obersten Bande bei gleichzeitiger Anwesenheit von NreA und NreB etwas stärker als nur mit NreB (Spur 4). NreA/NreB-Cross-Linking-Produkt und oligomeres NreB überlagern sich an dieser Stelle, sodass keine eindeutige Aussage getroffen werden kann, woraus die Bande gebildet wird.

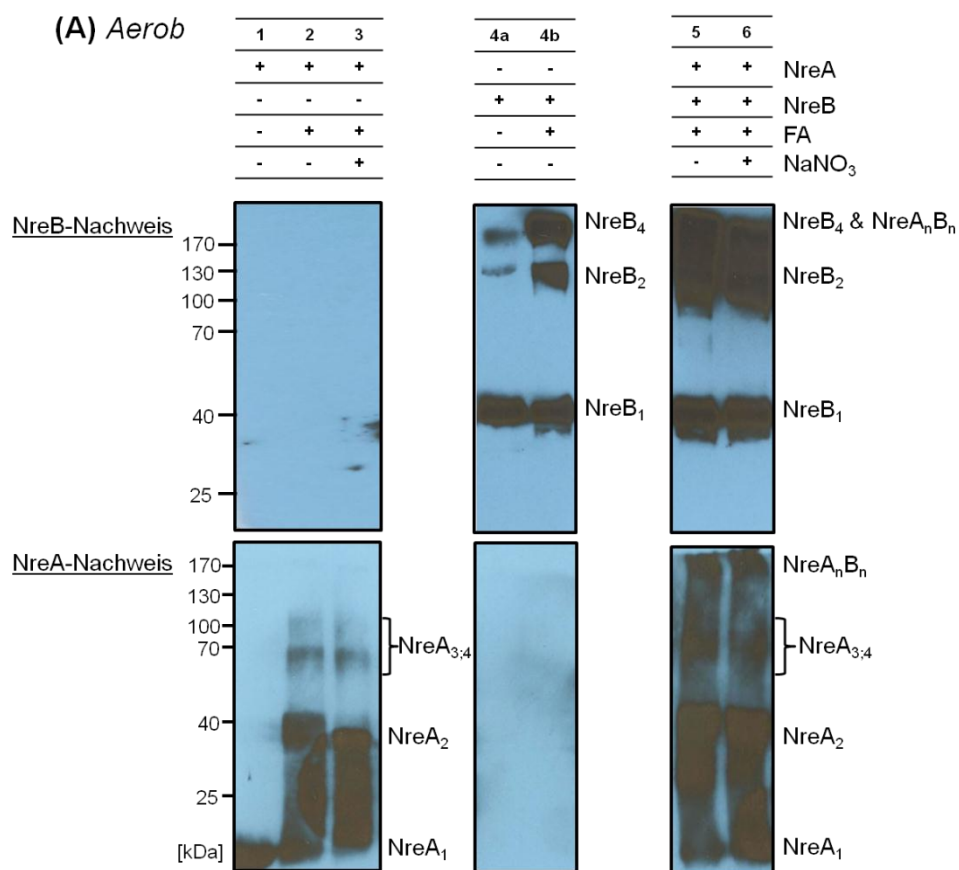
Um zu überprüfen, ob die oberste Bande in Spur 5 und 6 nur auf oligomeres NreB, wie in Spur 4, oder zusätzlich auf ein NreA/NreB-Interaktionsprodukt zurückzuführen ist, wurden die Cross-Linking-Ergebnisse mittels Western Blot Analyse analysiert. Dazu wurden die Cross-Linking-Proben nach Größenauftrennung im SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit polyklonalem Anti-NreA-Serum oder polyklonalem Anti-NreB-Serum inkubiert (Abbildung 4.31). NreA/NreB-Interaktionsprodukte sollten folglich mit beiden Anti-Seren nachweisbar sein.

Nach Fluoreszenz-Entwicklung der Western Blots konnten spezifische Banden von monomerem, dimerem und oligomerem NreB mit Anti-NreB-Serum (Abbildung 4.31A oben, 4.31B oben) und spezifische Banden von monomerem und dimerem NreA mit Anti-NreA-

Serum (Abbildung 4.31A unten, 4.31B unten) nachgewiesen werden. Diese Banden wurden bereits nach Coomassiefärbung der SDS-Gele beobachtet. Spuren ohne NreA entwickelt mit Anti-NreA-Serum (Spuren 1 - 3), sowie Spuren ohne NreB entwickelt mit Anti-NreB-Serum (Spur 4), zeigten keine Antikörperreaktion.

Bei den NreA-Cross-Linking-Proben waren in Anwesenheit von Formaldehyd weitere Banden vorhanden (NreA_{3,4}), die trimeren und tetrameren NreA-Formen entsprechen (jeweils Spur 2, 3, 5, 6 in 4.31A unten und B unten).

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von NreA und NreB (jeweils Spur 5, 6) sind neben den oligomeren NreA-Formen im hochmolekularen Bereich weitere Banden durch Reaktion mit Anti-NreA-Serum sichtbar. Die nach Coomassiefärbung an dieser Stelle vermuteten NreA/NreB-Interaktionsprodukte lassen sich also durch die spezifische Reaktion mit dem Anti-NreA-Serum tatsächlich nachweisen. Der genaue Oligomerisierungszustand des NreA/NreB-Interaktionsprodukts NreA_nB_n kann nicht genau bestimmt werden. Denkbar ist aber eine Verknüpfung in jeweils dimerer Form (NreA₂B₂).



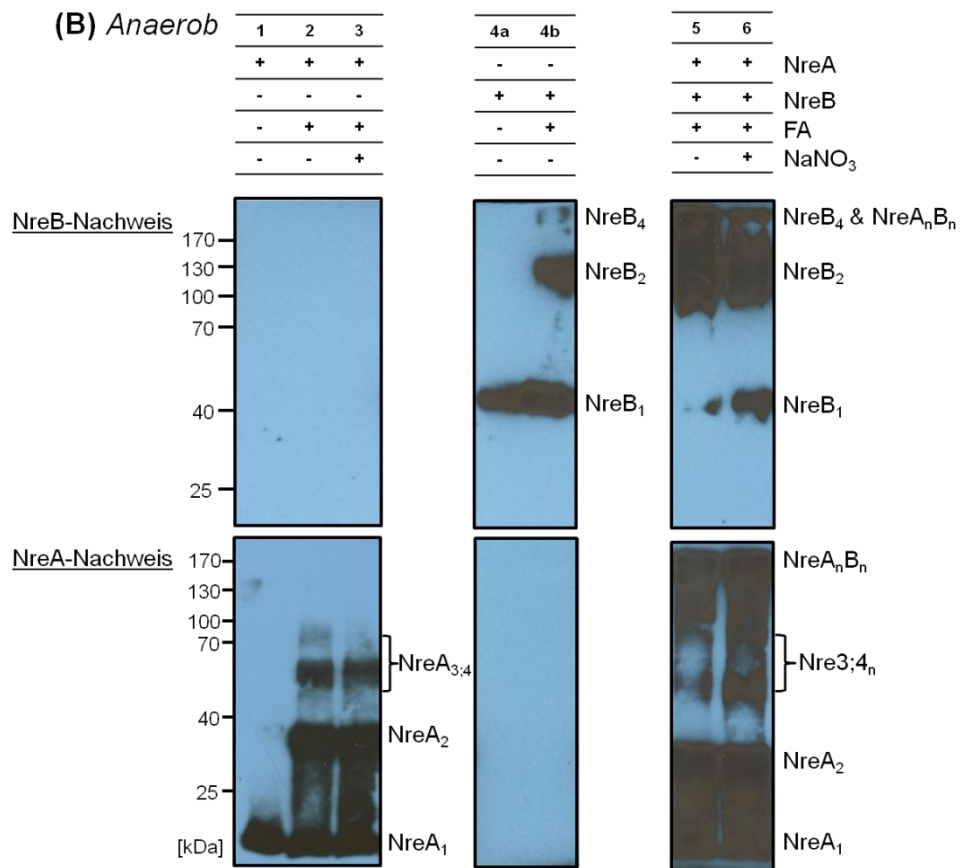


Abbildung 4.31: Aerobe (A) und anaerobe (B) *in vitro* Cross-Linking Experimente von NreA und NreB nach SDS-PAGE und Western Blot Analyse. Für die *in vitro* Cross-Linking Experimente wurden aerob, ohne beziehungsweise mit Nitrat aufgereinigtes His-NreA, bzw. His-NreA[NO₃] (pQE31-nreA) aus *E. coli* und aerob, beziehungsweise anaerob präpariertes NreB-His (pCQE1-nreB) aus *S. carnosus* verwendet, nachdem durch Dialyse Imidazol entfernt wurde. Jede aufgetragene Probe hatte ein Volumen von 5 µl und enthielt 2,5 µg NreA und/oder NreB. Das chemische Cross-Linking erfolgte aerob, beziehungsweise anaerob durch 1% (v/v) Formaldehyd (30 Minuten, 26 °C). Analysiert wurden die Proben nach Auftrennung im 12%-Acrylamid-SDS-Gel und Immunoblotting mit spezifischem, polyklonalem Anti-NreA-, beziehungsweise Anti-NreB-Serum.

4.14 *In vivo* Cross-Linking Experimente nach der His-Protein-Interaktions-Experimentmethode (HPINE)-Methode: Interaktion von NreA mit NreB

Durch BACTH-Messungen konnte *in vivo* bereits eine Interaktion von NreA/NreB gezeigt werden. Dieses Ergebnis konnte durch *in vitro* Cross-Linking-Experimente mit Formaldehyd untermauert werden. Aufgrund der Membrangängigkeit des Cross-Linking-Reagens ist eine chemische Vernetzung mit Formaldehyd auch *in vivo* möglich. Experimentell sollte eine NreA/NreB-Interaktion also auch *in vivo* mit der HPINE-Methode unabhängig von den vorigen beiden Methoden analysierbar sein.

Hierfür wurden plasmidcodiertes NreA und NreB co-exprimiert, wobei jeweils ein Protein einen Strep-tag und das andere einen His-tag trug (NreA-S mit NreB-H oder NreB-S mit NreA-H). Liegt ein NreA/NreB-Interaktionsprodukt vor, so wird dieses durch Zugabe von Formaldehyd in der exponentiellen Wachstumsphase chemisch verknüpft. Reinigt man anschließend das Protein mit His-tag nach Zellaufschluss über eine Nickel-NTA-Säule auf,

so wird das chemisch verknüpfte andere Protein mit Strep-tag coeluiert (Graf *et al.*, 2013). Liegt keine Interaktion *in vivo* vor, so erfolgt letztendlich auch keine Coelution des jeweiligen Strep-tag-Proteins.

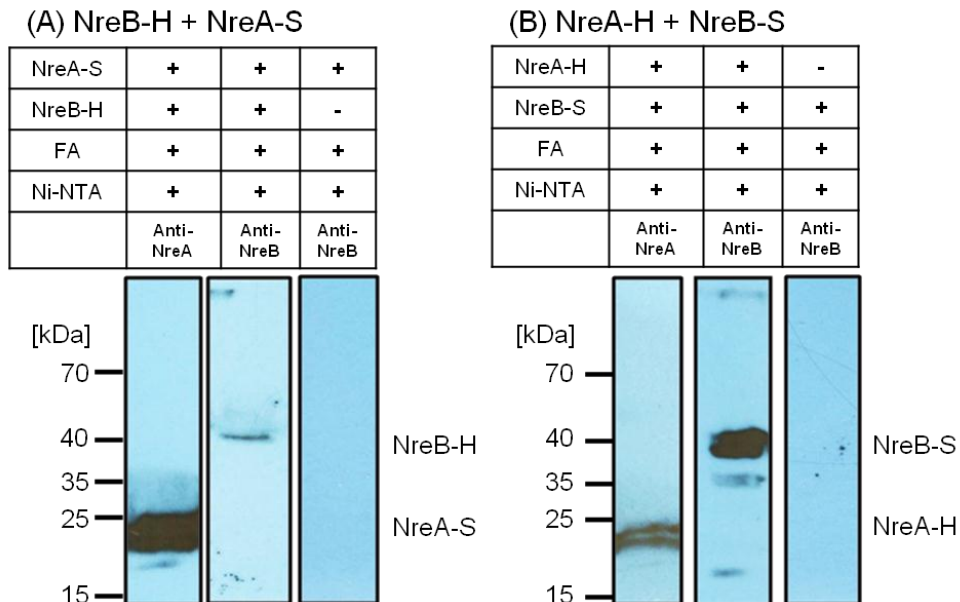


Abbildung 4.32: *In vivo* Bindungsstudien von NreA und NreB in *E. coli*. Für die Untersuchung der Bindung von NreA-Strep (NreA-S) an NreB-His (NreB-H) (A), sowie von NreB-Strep (NreB-S) an NreA-His (NreA-H) (B) und Co-Reinigung durch Nickel-NTA (HPINE) wurden NreA-S (pMW1243) und NreB-H (pMW1950), beziehungsweise NreB-S (pMW1192) und NreA-H (pMW1949) in *E. coli* JM109 co-exprimiert. Nach Induktion der Proteinexpression mit Anhydrotetracyclin (200 ng/ml; NreA-S, NreB-S) und Arabinose (0,01%; NreA-H, NreB-H) erfolgte zum chemischen Cross-Linking interagierender Proteine eine Formaldehydzugabe (0,6% (v/v)). NreA-H, bzw. NreB-H wurden mittels NTA-Säule gereinigt. Der Nachweis erfolgte mit spezifischem, polyklonalem Anti-NreA-, beziehungsweise Anti-NreB-Serum.

Für die Analyse auf vorliegende Coelution wurden die Proben mit SDS-Laufpuffer versetzt und aufgekocht, um gebildete Cross-Linking-Produkte wieder zu lösen. Die wieder erhaltenen Monomere wurden per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit polyklonalem Anti-NreA-Serum, beziehungsweise polyklonalem Anti-NreB-Serum nachgewiesen. Das Ergebnis des Interaktionsnachweises nach der HPINE-Methode von NreA-S mit NreB-H ist in Abbildung 4.32A, die von NreB-S mit NreA-H in Abbildung 4.32B gezeigt.

Bei der Aufreinigung von NreB-H konnte neben der NreB-Monomerbande (Spur 2, Abbildung 4.32A) auch die Bande von NreA-S nachgewiesen werden (Spur 1). NreA-S wurde also mit NreB-H coeluiert. Zur Kontrolle, ob NreA-S nur in Anwesenheit von NreB-H spezifisch coeluiert, wurde NreA-S alleine auf die Nickel-NTA-Säule gegeben. Erwartungsgemäß wurde kein NreA-S an die Säule gebunden (Spur 3). Es lief durch die Säule durch (vgl. Anhang).

Die umgekehrte Variante ist in Abbildung 32B mit analogen Ergebnissen gezeigt. Auch hier werden nach *in vivo*-Cross-Linking NreA und NreB coeluiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Strep-tag gebundene Protein (NreA-S; NreB-S) nur von der Säule coeluiert werden konnte, wenn es zuvor mit dem jeweiligen His-tag Protein (NreB-H; NreA-H) in der Zelle interagiert und durch FA chemisch verknüpft worden war. Den Ergebnissen nach coeluiieren sowohl NreA-S mit NreB-H, als auch NreA-H mit NreB-S. Dies bedeutet letztendlich, dass NreA *in vivo* mit NreB interagiert.

5. Diskussion

Zweikomponentensysteme (TCS) sind in Bakterien zur Wahrnehmung von Umweltfaktoren weit verbreitet. Diese sind meist spezifisch auf einen äußeren Einflussfaktor ausgerichtet, sodass ein Organismus die Reize zahlreicher verschiedener Sensorsysteme benötigt, um adäquat auf die vorherrschenden Umweltbedingungen reagieren zu können.

Die Unterscheidung zwischen Sauerstoffan- und abwesenheit ist für die Wahl des effizientesten Energiestoffwechselweges vor allem bei fakultativ anaeroben Bakterien von großer Bedeutung (Unden, 2013). Unter aeroben Bedingungen wird Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwendet. Unter anaeroben Bedingungen muss optimalerweise wahrgenommen werden, ob ein alternativer Elektronenakzeptor wie Nitrat zur Atmung anwesend ist oder ob Gärungsstoffwechsel betrieben werden muss.

Das cytoplasmatische Zweikomponentensystem NreBC dient in *S. carnosus* zur direkten Perzeption von Sauerstoff. Dieses besteht aus der Sensorhistidinkinase NreB und dem Antwortregulator NreC (Kamps *et al.*, 2004; Müllner *et al.*, 2008). Die Zielgene der Nitratatmung werden nur unter anaeroben Bedingungen induziert und die Nitratreduktase NarGHI, die Nitritreduktase NirRBD und der Nitrattransporter NarT exprimiert. Durch Nitratreduktion erzielt *S. carnosus* eine höhere Energiekonservierung als durch Gärungsstoffwechsel, was sich durch besseres Wachstum im Anaeroben äußert (Schlag *et al.*, 2008).

Anknüpfend an diese Untersuchungen wurden zunächst die Funktion von NreA und dessen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *S. carnosus* im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

5.1 Zusammenhang zwischen Wachstum und Expression der Komponenten der Nitratatmung in Abhängigkeit von NreABC

Das Wachstum des *S. carnosus* Wildtypstamms TM300, sowie der chromosomalen Mutanten $\Delta nreABC$ (m1) und $\Delta nreA$, wurde in minimalem Medium unter aeroben und anaeroben Bedingungen ohne und mit Nitrat getestet. Um die beobachteten Wachstumsunterschiede unter den jeweiligen Bedingungen mit der vorherrschenden Genregulation der Nitratatmungskomponenten korrelieren zu können, wurden zudem Reporterstudien mit der *narG-lip*-Fusion durchgeführt. Auch hierfür wurden die Stämme mit den Geno- und Phänotypen Wildtyp, $\Delta nreA$ und $\Delta nreABC$ verwendet (vgl. Nilkens *et al.*, 2013).

Bei den aeroben Wachstumsexperimenten wurde kein Unterschied zwischen den Stämmen beobachtet. Wie zu erwarten, wird der aerobe Stoffwechsel durch die Mutationen nicht beeinflusst und alle drei getesteten Stämme konnten aerobe Atmung durchführen. Der

Zusatz von Nitrat führte im Aeroben in keinem Fall zu einem gesteigerten Wachstum. Bei ausreichendem Sauerstoffangebot im umgebenen Milieu ist die aerobe Atmung gegenüber anderen Energiestoffwechselwegen bevorzugt, da die Redoxpotentialdifferenz zwischen Sauerstoff ($E_0' = +0,82 \text{ V}$) und Elektronendonator größer ist als beispielweise bei Nitrat ($E_0' = +0,43 \text{ V}$) und damit eine höhere ATP-Ausbeute erzielt wird (Unden, 2013). Durch die Verwendung von Minimalmedium im Gegensatz zum Vollmedium (BM) erreichten alle Zuchten geringere Zelldichten, so dass der durch Schütteln eingetragene Sauerstoff ausreichte, um langanhaltende, lokale anaerobe Verhältnisse zu vermeiden. Die *narG-lip*-Reporterstudien unter aeroben Bedingungen zeigten dagegen signifikante Unterschiede für die verschiedenen Genotypen. Während der Wildtyp und die ΔNreABC -Mutante keine Induktion des *narG*-Promotors zeigten, war bei der ΔNreA -Mutante eine deutliche Aktivierung der Nitratatmungsgene zu beobachten. Diese lag bei ΔNreA im Aeroben sogar dann vor, wenn gar kein Nitrat vorhanden war. Die Ergebnisse der *narG-lip*-Expressionsmessungen decken sich mit der Beobachtung von Schlag *et al.* (2008), dass die chromosomale ΔnreA -Mutante bei aerobem Wachstum mit Nitrat viel früher eine Bildung von Nitrit zeigt als der Wildtypstamm. Ohne NreA wird folglich die Expression der Nitratatmungsgene unter aeroben Bedingungen nicht optimal reprimiert.

Unter anaeroben Bedingungen ist die Nitratatmung gegenüber dem Gärungsstoffwechsel energetisch besser gestellt. Die Anwesenheit von Nitrat sollte sich im Allgemeinen deutlich positiv auf Wachstumsgeschwindigkeit und Ertrag auswirken (Schlag *et al.*, 2008). Die Anwesenheit der Nitratatmungskomponenten ist dafür eine Voraussetzung. Beim Wachstum der nitrathaltigen Zuchten bis zum Eintreten der stationären Phase wurde dieser positive Einfluss sowohl beim Wildtyp TM300 als auch bei der ΔnreA -Mutante beobachtet, nicht jedoch bei der ΔnreABC -Mutante. Dies deckt sich mit der ausbleibenden *narG-lip*-Expression bei der ΔNreABC -Mutante, was bedeutet, dass die Nitratatmungsgene nicht aktiviert werden konnten. Statt den Stoffwechsel optimal den äußeren Bedingungen anpassen zu können, musste die ΔnreABC -Mutante anaerob unabhängig von einer Nitratanwesenheit permanent Gärungsstoffwechsel betreiben. Beim Wildtyp und der ΔNreA -Mutante zeigten die *narG-lip*-Reporterstudien unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat, dass die *narG*-abhängigen Gene der Nitratatmung exprimiert werden. NreB ist demnach als Sauerstoffsensoren aktiv und der phosphorylierte Antwortregulator NreC induziert die Transkription der Zielgene. Zusammengefasst scheint die Anwesenheit von NreBC, nicht jedoch von NreA nötig zu sein, um von der Nitratanwesenheit im Medium zu profitieren. Dies stimmt mit den Beobachtungen zur ΔnreABC -Mutante von Schlag *et al.* (2008) und ΔnreA -Mutante (Schlag, 2008) überein.

In der anaeroben, nitratfreien Zucht und der nitrathaltigen Zucht ab der stationären Phase war das Wachstum der ΔnreA -Mutante gegenüber dem des Wildtyps abgeschwächt. In den

narG-lip-Messungen führte die Deletion von NreA dazu, dass die spezifischen Lipaseaktivitäten ohne und mit Nitrat auf dem gleichen Niveau lagen. Die Ergebnisse decken sich mit der Annahme, dass NreA als Nitratrezeptor und negativer Regulator der NreBC-abhängigen Induktion der Nitratatmungsgene fungiert (Schlag *et al.*, 2008). NreA scheint in Abwesenheit von Nitrat die Expression der entsprechenden Gene zu drosseln. Fällt diese regulatorische Funktion durch die NreA-Deletion weg, so wird auch unter nitratfreien Zuchtbedingungen die Expression der Zielgene induziert. Die Bedeutung von NreA für die Funktion der Nitratatmungsregulation in *S. carnosus* wird dadurch untermauert, dass sowohl durch die Komplementierung der $\Delta nreA$ -Mutante als auch der $\Delta nreABC$ -Mutante zum wildtypischen Genotyp ein wildtypisches *narG-lip*-Expressionsmuster (Phänotyp: Wildtyp mit Nitratstimulierung und aerober Repression) zurückerhalten wurde.

Aus den Versuchen lässt sich schließen, dass es sich bei NreA um einen negativen Regulator der Expression der Nitratatmungsgene handelt, der in Abhängigkeit von Nitrat fungiert. Um diese Funktion übernehmen zu können, muss NreA einerseits in der Lage sein Nitrat zu erkennen und andererseits die Information über An- oder Abwesenheit von Nitrat in regulierender Art und Weise weiterzugeben.

5.2 NreA – ein GAF-Domänen Protein mit Nitratrezeptorfunktion

Auf Basis von Sekundärstrukturvorhersagen wurde NreA von Fedtke *et al.* (2002) eine GAF-Domäne zugesprochen. GAF-Domänen (cGMP-spezifische Phosphodiesterase-Adenylatzyklase-Fh1A) bilden eine Proteindomänenfamilie, die in allen drei Domänen des Lebens vorkommt. Sie binden typischerweise kleine Moleküle, wie beispielsweise cyclische Nukleotide und Tetrapyrrole, aber auch Methylsulfoxid, 2-Oxoglutarat und Acetat (Aravind und Ponting, 1997; Anantharaman *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2002b; Zoraghi, *et al.*, 2004; Bruder *et al.*, 2005; Handa *et al.*, 2008; Essen *et al.*, 2008; Gruez *et al.*, 2010; Little *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2007). Charakteristisch für sie sind sensorische, regulatorische oder auch katalytische Funktionen (Aravind und Ponting, 1997; Zoraghi, *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2007), indem sie die meist N- oder C-terminal verknüpften, katalytischen Domänen, wie ATPasen, Histidinkinasen oder andere enzymatische Domänen beeinflussen. Die Kristallstrukturen von NreA belegen, dass auch NreA in der Lage ist, kleine Moleküle zu binden. Nitrat und Iodid können in der Bindungstasche fixiert werden. Im Gegensatz zu anderen Proteinen besitzt es aber keine weiteren Domänen, sodass eine Informationsweitergabe *in trans* erfolgen muss.

5.2.1 Physiologische Relevanz der Bindung von Nitrat und Iodid in NreA

Die Bedeutung von Nitrat als Fitnessfaktor für *S. carnosus* konnte, wie oben beschrieben, in Wachstumsexperimenten gezeigt und durch die *narG-lip*-Reportergerinstudien erklärt werden.

Nitrat hat einen Einfluss auf NreA, welches dann in die Expression der Nitratatmungsgene regulierend eingreift.

Den Kristallstrukturen zufolge findet auch Iodid in der gleichen Bindungstasche wie Nitrat Platz und kann fixiert werden. Die Bindung erfolgt durch die identischen Reste wie bei der Nitratbindung. Zu vermuten ist, dass dies lediglich der Fall ist, weil Iodid ebenfalls ein einfach negativ geladenes Anion mit einem ähnlichen Ionenradius ist. Über das natürliche Habitat von *S. carnosus* ist wenig bekannt (Rosenstein *et al.*, 2009), es ist demnach nicht absolut auszuschließen, dass Iodid im Lebensraum vorkommt. Bei der Rohwurstfermentation, bei der der apathogene *S. carnosus* für die Nitritbildung eingesetzt wird (Schleifer und Fischer, 1982; Götz und Schleifer, 1983; Becker *et al.*, 2007), ist Iodid zumindest keine in signifikanten Mengen vorhandene Komponente. Obwohl Nitrat demnach der natürliche Ligand zu sein scheint, wurde beobachtet, dass die *narG-lip*-Stimulierung durch Iodid in ähnlicher Weise erfolgt, wenn auch die Sensitivität im Vergleich zu Nitrat geringer ist.

Auch wenn der Effekt von Iodid für *S. carnosus* physiologisch nicht relevant ist, zeigt er, dass die Regulation der Nitratatmung durch die Bindung eines passenden Liganden in NreA beeinflusst wird. Die Kristallstruktur der GAF-Domäne von NreA mit Nitrat bestätigt die bisherigen Annahmen und Hinweise aus Wachstumsversuchen und Reporterstudien, sowie literaturbekannten Nitritbildungsmessungen (Schlag, 2008), dass NreA innerhalb des NreABC-Systems als Nitratrezeptor fungiert.

5.2.2 Vergleich von NreA mit anderen GAF-Domänen-Proteinen

Die Klassifizierung von NreA als GAF-Domänen-Protein beruhte bei Fedtke *et al.* (2002) auf der Vorhersage der Abfolge der Sekundärstrukturelemente. Die anhand der Kristallstruktur von NreA erkennbare Abfolge weicht von der Vorhersage (Singenstreu, 2010), vor allem in der Anzahl der β -Faltblätter, ab (Abbildung 5.1 C1, C2).

GAF-Domänen zeigen eine ähnliche Faltung wie PAS-Domänen, welche ein antiparalleles β -Faltblatt aus 5 Strängen besitzen (benannt nach Per, Arnst und Sim; Ponting und Aravind, 1997; Taylor und Zhulin, 1999). Neben GAF-Domänen mit 6 β -Faltblättern, wie bei der ersten GAF-Kristallstruktur von Ykg9 aus *S. cerevisiae* (Ho *et al.*, 2000), wurden später weitere Strukturen gefunden, die nur über 5 β -Faltblätter verfügen, wie beispielsweise DosT aus *Mycobacterium tuberculosis* (Podust *et al.*, 2008) oder CodY aus *Bacillus subtilis* (Levdikov *et al.*, 2006 und 2009). GAF-Domänen charakterisieren sich vor allem durch die zentrale β -Faltblattstruktur, welche auf der einen Seite aus einer Mischung aus kurzen α -Helices und Schleifen, wodurch die Ligandenbindetasche geformt wird, und auf der gegenüberliegenden Seite durch 2 - 4 α -Helices umgeben ist (Martinez *et al.*, 2002). Die Abfolge der Sekundärstrukturelemente variiert für verschiedene GAF-Domänen (Abbildung 5.1), was auch bei PAS-Domänen beobachtet wurde (Scheu *et al.*, 2010).

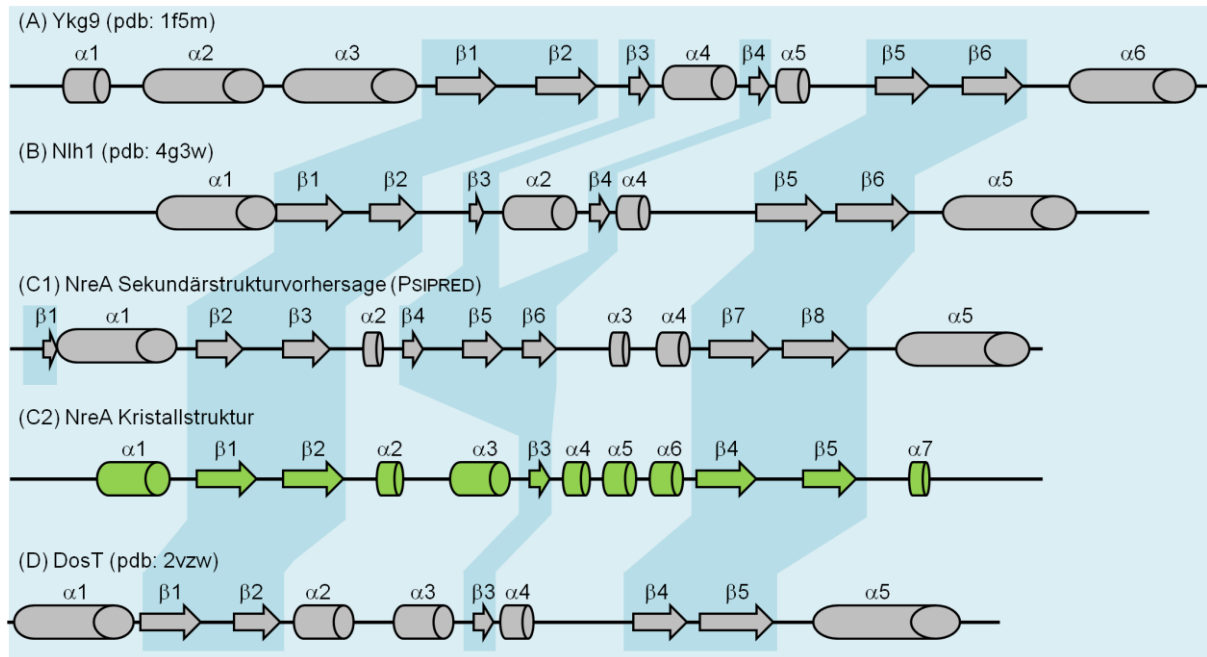


Abbildung 5.1: Sekundärstrukturelemente von Ykg9, Nlh1, NreA und DosT. Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente der GAF-Domänen von (A) Ykg9 von Aminosäure 1 - 180 (Ho *et al.*, 2000), (B) Nlh1 von Aminosäure 1 - 171 (Batchelor *et al.*, 2013), (C1) Strukturvorhersage von NreA von Aminosäure 1 - 155 mittels PSIPRED (Stand 11/2010; Singenstreu, 2010), (C2) NreA von Aminosäure 11 - 153 (Niemann *et al.*, 2013) und (D) DosT von Aminosäure 60 - 208 (Podust *et al.*, 2008).

NreA zeigt die gleiche Abfolge der Sekundärstrukturelemente wie die GAF-Domäne von DosT (Abbildung 5.1 C2, D). Lediglich die ausgeprägte C-terminale α 7-Helix ist in der Kristallstruktur mit Nitrat sehr kurz und daher kaum zu erkennen. Dafür liegen zwischen β 3 und β 4 drei α -Helices anstatt nur einer. Auch die Anordnung der β -Faltblätter mit der Abfolge 2-1-5-4-3 ist in der Tertiärstruktur bei NreA und DosT identisch. Die starke Ähnlichkeit zeigt sich bei einer Überlagerung der Kristallstrukturen von NreA und der GAF-Domäne von DosT (DosT-G; Abbildung 5.2). Entsprechendes lässt sich für die enge strukturelle Übereinstimmung von NreA und der GAF-Domäne von Nlh1 *aus Aquifex aeolicus* (Nlh1-G1; Batchelor *et al.*, 2013) feststellen. Auch hier verdeutlicht die Überlagerung der Kristallstrukturen die hohe Deckungsgleichheit der beiden Tertiärstrukturen.

Anhand der Vergleiche der Sekundär- und Tertiärstruktur von NreA mit denen von anderen Proteinen lässt sich NreA eindeutig der GAF-Protein-Familie zuordnen.

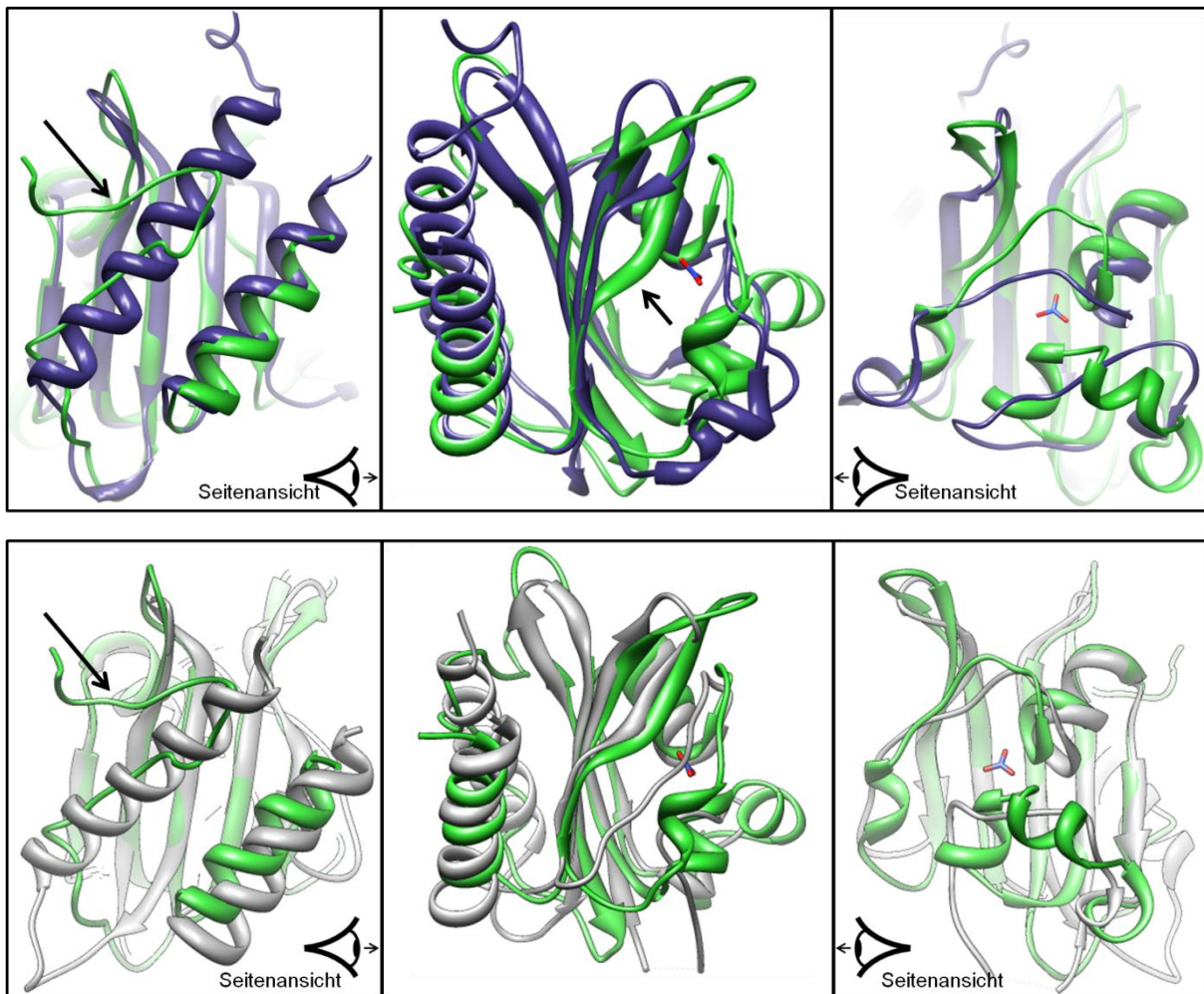


Abbildung 5.2: Überlagerung der Kristallstrukturen von NreA und DosT-G, sowie NreA und Nih1-G1. Die Kristallstrukturen wurden von NreA in grün und DosT-G (pdb: 2vzw; Podust *et al.*, 2008) in violett (oben), sowie NreA in grün und Nih1-G1 (pdb: 3g3w; Batchelor *et al.*, 2013) in grau (unten) mit dem Programm CHIMERA übereinandergelegt. Die Gesamtstrukturen (Mitte) sind von rechts und links in Seitenansicht gezeigt. Schwarze Pfeile verdeutlichen Unterschiede in der β -Faltblattstruktur (Mitte) und die fehlende, lange C-terminale α -Helix bei NreA (links).

5.3 Vergleich mit anderen Nitratbindeproteinen - NreA ist ein neuartiger Nitratrezeptor

Für viele Organismen ist die Bindung von Nitrat, vor allem in seiner Funktion als Elektronenakzeptor, von Bedeutung. Nur wenige Kristallstrukturen mit gebundenem Nitrat liegen vor, in denen Nitrat eine physiologische Relevanz besitzt, weshalb über die molekularen Mechanismen der Nitratbindung nicht viel bekannt ist.

Beim Vergleich von NreA mit dem periplasmatischen Protein NrtA aus *Synechocystis sp.* (pdb: 2G29, Koropatkin *et al.*, 2006) und der Sensorhistidinkinase NarX aus *E. coli* (pdb: 3EZJ; Cheung und Hendrickson, 2009) zeigt sich, dass die drei Proteine verschiedene Lösungen entwickelt haben um Nitrat zu binden (Abbildung 5.3).

Die Gesamtstrukturen von NreA, NrtA und NarX unterscheiden sich deutlich. NrtA und NarX sind Multidomänenproteine, während NreA ein Einzeldomänenprotein ist. Die Multidomänenproteine fixieren Nitrat entweder zwischen zwei Domänen in einer *C-clamp* (NrtA) oder zwischen zwei Monomeren in einem Vierhelixbündel (NarX). Die Bindung von

Nitrat erfolgt bei NrtA und NarX, indem von beiden Untereinheiten Wasserstoffbrückenbindungen zu Nitrat ausgebildet werden und eine Kompensierung der negativen Ladung durch positiv geladene Reste in der Bindungstasche erfolgt. Insbesondere Salzbrücken zu Lysin und Arginin sorgen bei NrtA und NarX für eine Fixierung des Liganden. NreA muss die Nitratbindung aufgrund seiner Struktur auf eine andere Art und Weise lösen. Die GAF-Domäne besitzt eine Bindetasche mit passender Geometrie, in der die negative Ladung von Nitrat durch die Ausbildung von Dipolmomenten der Helices $\alpha 3$ und $\alpha 6$ relativiert wird, ähnlich wie die der Phosphorylgruppe von cNMP in Phosphordiesterasen (Heikaus *et al.*, 2009; Turko *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2004; Niemann *et al.*, 2013). Wasserstoffbrücken unterstützen die Ligandenbindung. Bei NreA befinden sich weder Lysin noch Arginin im Zentrum, sodass keine Salzbrücken vorliegen. Ein möglicher Vorteil dieses Bindungsmechanismus könnte sein, dass die Bindung von Nitrat in NreA damit weder zu stark noch zu schwach ist. Eine reversible Ligandenbindung ist für eine sensorische Funktion als Nitratrezeptor wichtig, damit Änderungen der Konzentration in der Umgebung überhaupt wahrgenommen werden können. Nitrat kann dadurch bei Nitratmangel wieder vom Rezeptor NreA abgegeben werden.

Bei allen drei betrachteten Proteinen wird Nitrat vollständig in einer geschlossenen Bindetasche fixiert und dabei komplett von der Umgebung abgeschirmt. Bei NreA wird die

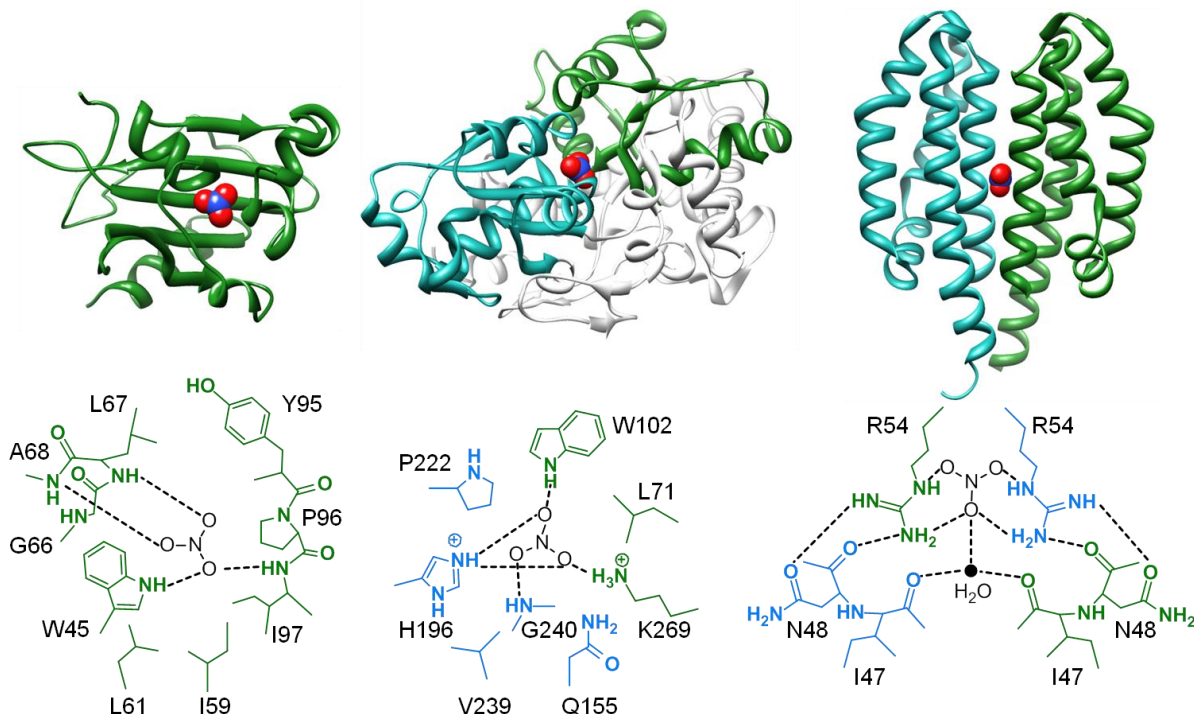


Abbildung 5.3: Nitratbindepoteine mit Bindungstasche (Niemann *et al.*, 2013). Neben den Gesamtstrukturen der nitratbindenden Proteine (oben) NreA aus *S. carnosus* (A) und NrtA aus *Synechocystis sp.* (B, pdb: 2G29, Koropatkin *et al.*, 2006) und NarX aus *E. coli* (C, pdb: 3EZJ; Cheung und Hendrickson, 2009) sind die Bindungstaschen mit gebundenem Nitrat veranschaulicht. Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen werden durch rote, gestrichelte Linien symbolisiert.

Bindetasche ausschließlich von einem Monomer geformt, während Nitrat bei NrtA und NarX zwischen zwei Domänen komplexiert wird. Es stellt sich die Frage, wie Nitrat jeweils in die vollständig umschlossene Bindungstasche gelangen kann.

In der Zwei-Domänen-Lösung wird der Zugang von Nitrat zur Bindetasche ermöglicht, indem zunächst eine kleine Verschiebung der Kontaktfläche zwischen den Domänen stattfindet. Bereits eine kleine Veränderung der relativen Positionen der Domänen zueinander kann ausreichen, die Bindungsaffinität der beiden Domänen signifikant zu beeinflussen. Wird die Interaktion der beiden Untereinheiten geschwächt, kann eine Struktur resultieren, in der Nitrat nicht mehr vollständig umschlossen ist. In dieser Konformation kann ein Hinein- und Herausdiffundieren des Liganden erfolgen.

Auf die Ligandenbindung in einer GAF-Domäne folgt oftmals eine Konformationsänderung, aus der sich eine Aktivierung oder Aufhebung einer regulatorischen Funktion ergibt (Batchelor *et al.*, 2013; Levdikov *et al.*, 2009). Durch die Gestaltung der Umgebung der Bindetasche mit kurzen α -Helices und Schleifen, ist es möglich, dass NreA in diesem Bereich recht flexibel ist.

Da in der Kristallstruktur von NreA Nitrat vollständig von der Umgebung abgeschirmt ist, existiert NreA vermutlich noch in einer anderen, offenen Konformation, in der der Austausch des Liganden mit der Umgebung erfolgen kann. In dieser offenen Struktur sollte die Nitratbindung im Vergleich zur geschlossenen Variante geschwächt sein. Beispielsweise könnte man eine solche veränderte Tertiärstruktur durch eine Verschiebung der Helices α_3 und α_6 erhalten. Eine genaue Analyse möglicher Strukturänderungen bedarf jedoch einer Kristallstruktur von NreA ohne Nitrat.

5.4 NreA interagiert mit NreB und bildet einen NO_3^-/O_2 -Sensorkomplex

Die Wachstums- und *narG-lip*-Reportergergenstudien bestätigten NreA als Repressor der NreBC-kontrollierten Expression der Nitratatmungsgene in Abhängigkeit von Nitrat. BACTH-Experimente und Cross-Linking-Versuche zeigen, dass NreA mit NreB, nicht jedoch mit NreC interagiert. Die Befunde stimmen mit Phosphorylierungsexperimenten von NreB überein, die *in vitro* durchgeführt wurden (Nilkens *et al.*, 2013). In den Phosphorylierungsexperimenten wurde gezeigt, dass NreA einen direkten Effekt auf NreB hat, indem es die Phosphorylierung von NreB signifikant unterbindet. NreA inhibiert die Kinaseaktivität. Die Dephosphorylierung von NreB wird nicht beeinflusst und NreA besitzt keine Phosphataseaktivität. Da zudem keine Bindung von NreA an die Promotor-DNA von *narG*, *nirR* und *narT* mit *frame shift*-Experimenten ermittelt wurde (Reinhart, 2010; Nilkens *et al.*, 2013), liegt die regulatorische Funktion von NreA höchstwahrscheinlich ausschließlich auf der Proteinebene.

In den BACTH-Messungen zeigte sich ein wesentlich stärkerer Effekt von Nitrat auf die Interaktion innerhalb des NreA/NreB-Sensorkomplexes im Vergleich zur leichten Interaktionsabnahme aufgrund eines Salzeffektes bei der Positivkontrolle und den anderen Interaktionsmessungen. Die NreA/NreB-Interaktion wurde durch Nitrat drastisch herabgesetzt, einhergehend mit einer reduzierten Interaktion der NreA-Monomere. Die negative regulatorische Funktion von NreA wird demnach durch Nitrat aufgehoben. Dies passt zu der Beobachtung, dass die Phosphorylierung von NreB durch NreA[NO₃⁻] im Gegensatz zu NreA nicht inhibiert wird (Nilkens *et al.*, 2013).

NreA ist ein GAF-Domänen-Protein, während NreB N-terminal eine PAS-Domäne mit dem sauerstoffsensitiven [Fe₄S₄]²⁺-Cluster besitzt. PAS-Domänen sind bekannt dafür, dass sie oft Co-Sensoren oder Co-Aktivatoren binden und zusammen ein Signal integrieren (Razeto *et al.*, 2004; Partch und Gardner, 2010; Witan *et al.*, 2012). Daher kann man vermuten, dass die Wechselwirkung zwischen NreA und NreB über eine direkte Interaktion zwischen der GAF-Domäne und der PAS-Domäne erfolgt. Diese Vermutung würde sich durch BACTH-Interaktionsmessungen zwischen NreA und der isolierten PAS-Domäne von NreB überprüfen lassen.

Zusammengenommen interagiert NreA auf Proteinebene mit NreB in Abhängigkeit von Nitrat, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen. Es resultiert ein NreA/NreB-Sensorkomplex in dem NreA Nitrat und NreB Sauerstoff registriert. Beide Signale werden miteinander gekoppelt und von NreB an NreC als Antwortregulator weitergegeben.

5.5 Mögliche Flächen zur Dimerisierung von NreA und zur Interaktion mit NreB

5.5.1 Dimerisierungsformen von GAF-Domänen

Proteininteraktionen laufen über intermolekulare Wechselwirkungen zwischen oberflächenexponierten Bereichen der beteiligten Proteine ab. Aufgrund der BACTH-Studien ist anzunehmen, dass NreA-Monomere durch Nitrat weniger interagieren. In den Kristallstrukturen war NreA in Form von NreA[NO₃⁻], beziehungsweise NreA[I⁻], ebenfalls als Monomer erkennbar.

Berechnungen über PISA (Krissinel und Henrick, 2005) ergaben auf Basis der Kristallstruktur keinen Hinweis auf Interaktionsflächen für eine Homodimerisierung. Der CCS-Wert (Complexation Significance Score) von 0,000 der größten potentiellen Kontaktfläche von 607 Å² zeigte, dass diese nicht für eine effektive Interaktion von zwei NreA-Molekülen ausreicht.

Nitratfreies NreA scheint laut Cross-Linking-Experimenten und BACTH-Studien als Dimer vorzuliegen, welches als Repressor mit NreB interagiert. Nitratfreies NreA sollte eine andere Struktur aufweisen als NreA[NO₃⁻], mit entsprechenden Kontaktflächen zur Bildung des NreA/NreA-Homodimers und zur Interaktion mit NreB. Möglicherweise sind diese

Kontaktflächen in der Struktur von NreA[NO₃]⁻ erkennbar. Ohne eine nitratfreie Kristallstruktur ist keine Berechnung von möglichen Interaktionsflächen möglich.

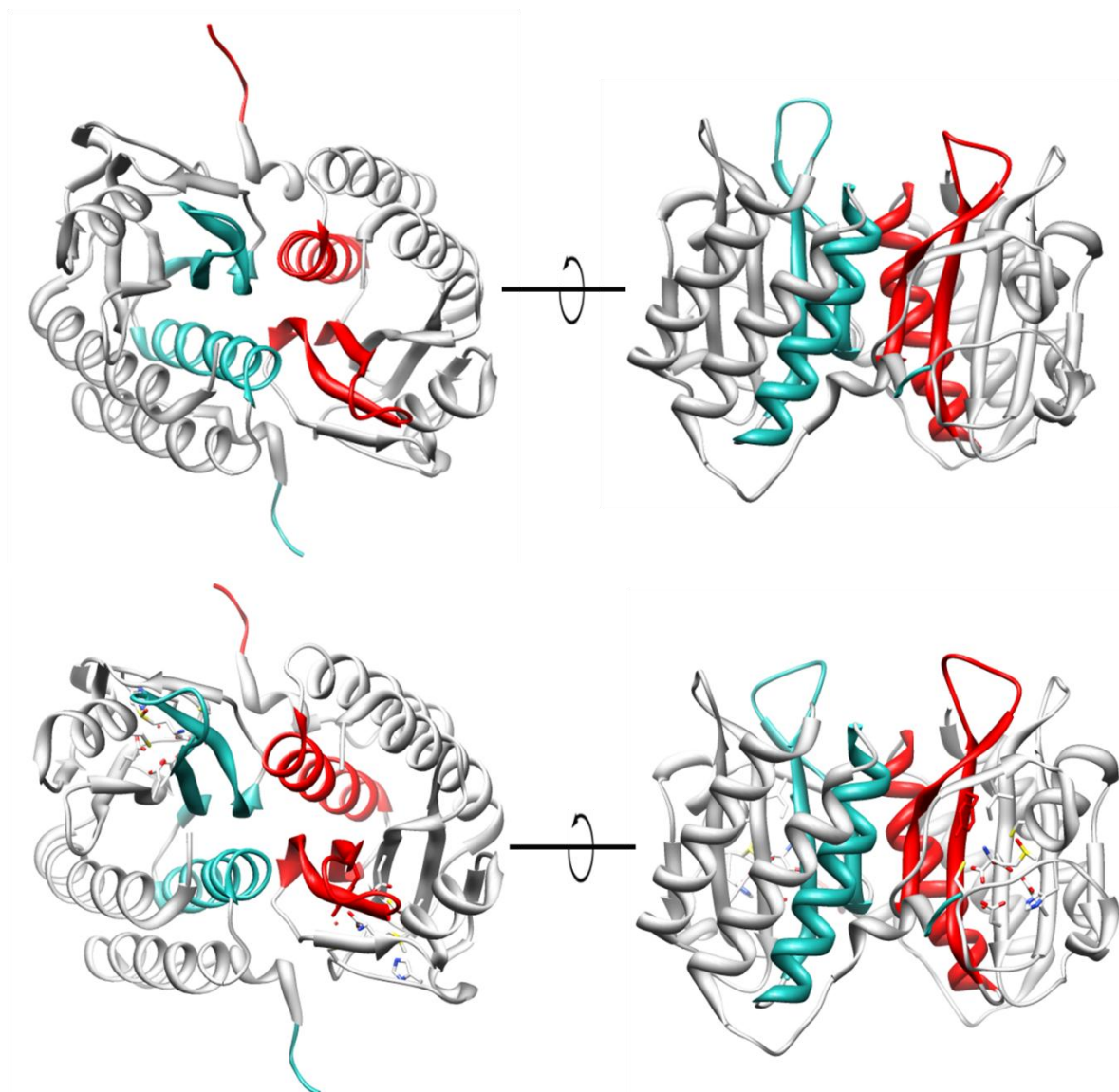


Abbildung 4.4: Gesamtstruktur von Ykg9 (pdb: 1f5m) ohne Substrat (oben) und Ykg9 (pdb: 3ko6) mit Methioninsulfoxid (unten). Die Kristallstruktur der freien Methionin-R-sulfoxidreduktase Ykg9 ohne Substrat aus *S. cerevisiae* S288c in dimerer Form und einer Auflösung von 1,9 Å (Ho *et al.*, 2000), beziehungsweise 2,55 Å (Ma *et al.*, 2009; Protein Data Bank, Europa). Die Interaktion erfolgt über das N-terminale Ende, $\alpha 2$, $\beta 2$, $\beta 3$ und die $\beta 2$ - $\beta 3$ Schleife (Ho *et al.*, 2000). Die Interaktionsfläche ist 2200 Å² groß.

Verschiedene GAF-Proteine interagieren im Dimer auf unterschiedliche Weise. Bei NCBI sind 115 Kristallstrukturen von GAF-Domänen hinterlegt (Stand 09/2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/?term=GAF>). Anhand von unterschiedlichen GAF-Dimeren sollen Interaktionsmechanismen verdeutlicht werden, die auch für dimeres NreA in Frage kommen könnten. In den Abbildungen 4.4, 4.5 und 4.6 sind die Kristallstrukturen der dimeren GAF-Domänen der freien Methionin-R-sulfoxidreduktase Ykg9 aus *S. cerevisiae* ohne (Ho *et al.*, 2000) und mit dem Substrat Methioninsulfoxid (Protein Data Bank, Europa,

Ma *et al.*, 2009), von DosT aus *Mycobacterium tuberculosis* mit permanent gebundenem Häm (Podust *et al.*, 2008) und von Nlh1 aus *Aquifex aeolicus* in der apo-Form (Batchelor *et al.*, 2013) gezeigt.

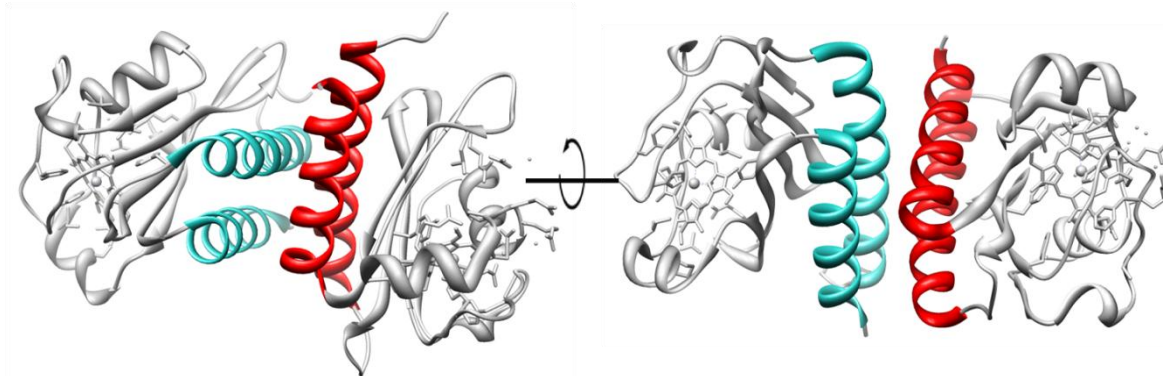


Abbildung 4.5: Gesamtstruktur von DosT-G (pdb: 2vzw). Die Kristallstruktur der GAF-Domäne von DosT mit gebundenem Häm aus *Mycobacterium tuberculosis* in dimerer Form und einer Auflösung von 2,3 Å (Podust *et al.*, 2008). Die Interaktion erfolgt jeweils über die Helices $\alpha 1$ und $\alpha 7$. Die Helices der beiden Monomere liegen etwa um 90° gedreht zueinander.

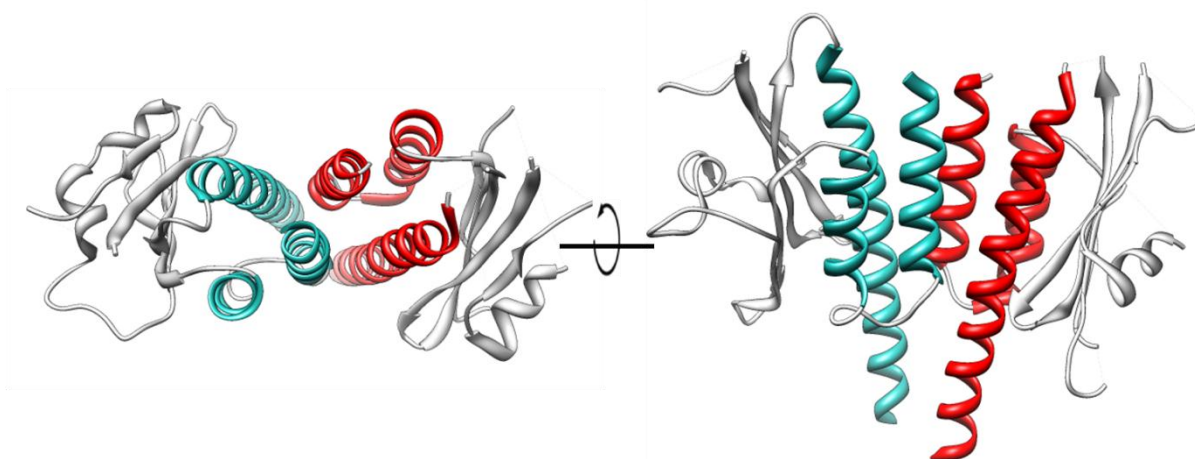


Abbildung 4.6: Gesamtstruktur von Nlh1-G1 (pdb: 4g3w). Die Kristallstruktur der GAF-Domäne von Nlh1 in der ligandfreien, offenen apo-Form aus *Aquifex aeolicus* in dimerer Form und einer Auflösung von 1,7 Å (Protein Data Bank, Europa 2012; Batchelor *et al.*, 2013). Die Interaktion erfolgt über ein Helix-Bündel der Helices $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 5$. Die Fläche ist 1150 Å² groß.

Während Ykg9 über das N-terminale Ende, $\alpha 2$, $\beta 2$, $\beta 3$ und die $\beta 2$ - $\beta 3$ Schleife interagiert, verwenden die anderen beiden Proteine α -Helices der N- und C-terminalen Enden für die Dimerisierung, davon je zwei/drei aus jedem Monomer (Ho *et al.*, 2000). Bei DosT sind die Helices $\alpha 1$ und $\alpha 6$ der Monomere um etwa 90° verdreht (Podust *et al.*, 2008; Vos *et al.*, 2012). Bei Nlh1 sind die Helices in einem verdrehten Helix-Bündel angeordnet, ähnlich dem 4-Helix Bündel bei SpoVT (Asen *et al.*, 2009). SpoVT kristallisiert als Monomer. Allerdings liegen Berechnungen zufolge Dimerisierungsflächen vor. SpoVT-Moleküle interagieren durch hydrophobe Wechselwirkungen der $\alpha 2$ -Helix mit der $\alpha 5$ -Helix des Nachbarproteins (Asen *et al.*, 2009), wobei die $\alpha 1$ -Helix von NreA der $\alpha 2$ -Helix von SpoVT homolog ist (Niemann *et al.*,

2013; Handel, 2013). Der C-Terminus von NreA wurde zwar nicht als ausgedehnte α 7-Helix im Kristall aufgelöst, aber in den Vorhersagen der Sekundärstruktur (PSIPRED, Singenstreu, 2010) wurde diese an dieser Stelle prognostiziert.

Zusammengefasst sind die Möglichkeiten für eine Dimerisierung von zwei GAF-Domänen sehr divers. Es kann daher nicht per se vorhergesagt werden, welcher Bereich der Oberfläche von NreA für eine Homodimerisierung herangezogen wird.

5.5.2 Ligandenbindung bewirkt Konformationsänderungen von GAF-Domänen

Neben Hinweisen auf eine mögliche Art der Dimerisierung von NreA zeigen die Vergleiche mit anderen GAF-Domänen auch die denkbaren, unterschiedlichen Konformationsänderungen durch Ligandenbindung. NreA bedient sich als Nitratrezeptor möglicherweise einer ähnlichen Strategie. Ykg9 mit 179 Aminosäuren besteht, genau wie NreA, lediglich aus einer GAF-Domäne. Sowohl die Form ohne als auch mit Ligand bildet ein Dimer. Beide Kristallstrukturen konnten gelöst werden. Durch die Bindung von Methioninsulfoxid ändert sich die Konformation, auch wenn diese Veränderung nur gering ausfällt (Abbildung 5.7).

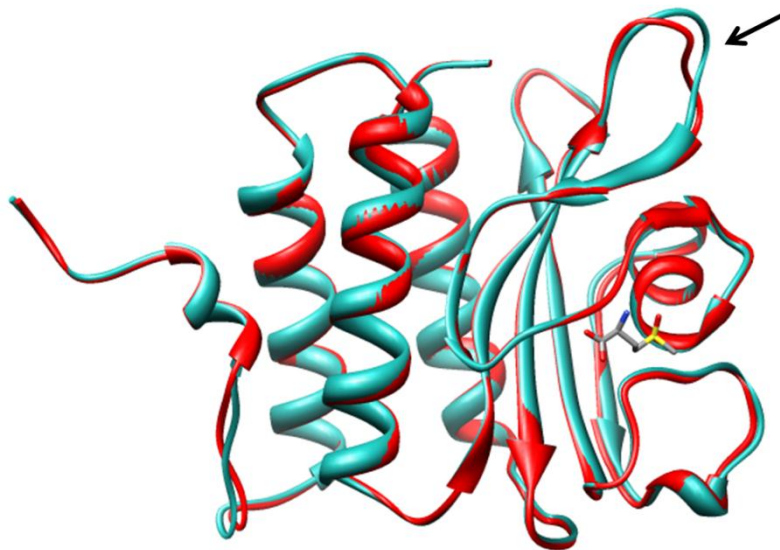


Abbildung 5.7: Überlagerung von Ykg9 ohne und mit dem Substrat Methioninsulfoxid. Die Kristallstrukturen von Ykg9 aus *S. cerevisiae* S288c ohne Substrat in blau (pdb: 1f5m; Ho *et al.*, 2000) und Ykg9 mit Substrat (pdb: 3ko6; Ma *et al.*, 2008) wurden in monomerer Form mit dem Programm CHIMERA übereinandergelegt. Der schwarze Pfeil weist auf die größte Konformationsänderung in der β 1 - β 2-Scheife.

Wie die freie Methionin-(R)-sulfoxidreduktase aus *E. coli* (Lin *et al.*, 2007) setzt Ykg9 vermutlich sein Substrat katalytisch um, sodass eine große Konformationsänderung für die Funktion nicht benötigt wird. DosT bindet permanent ein Häm als Cofaktor, worüber es die Gase NO, CO und O₂ wahrnimmt. Es besteht aus zwei GAF-Domänen und einer Histidinkinase. Durch Sauerstoffbindung in der GAF-Domäne ändert sich deren

Konformation vom deoxy-Zustand (mit H₂O) zum oxy-Zustand (mit O₂) (Podust *et al.*, 2008; Vos *et al.*, 2012). Durch die Strukturveränderung kann die Aktivität der Histidinkinase beeinflusst werden und diese entsprechend den Antwortregulator DosR phosphorylieren.

Ein anschauliches Beispiel für den Zusammenhang zwischen Ligandenbindung, Konformationsänderung und Signalweitergabe stellt das von Batchelor *et al.* (2013) untersuchte Protein Nlh1 aus *Aquifex aeolicus* dar. Für die GAF-Domäne des Multi-Domänen-Proteins konnten drastische Strukturveränderungen in Folge der Ligandenbindung beobachtet werden (Abbildung 5.8). Während in der Struktur der GAF-Domäne ohne Ligand auf der gegenüberliegenden Seite der Bindungstasche drei ausgedehnte α -Helices zur Bildung eines Homodimers zur Verfügung stehen (Nlh1-G1-Zustand), sind in der Struktur mit Ligand nur zwei α -Helices vorhanden (Nlh1-G2-Zustand). Dies wird damit begründet, dass sich bei Ligandenbindung das β 2-Faltblatt einmal um die eigene Längsachse dreht, wodurch der Rest R58 mit β 2 um 180° rotiert (Abbildung 5.9). In der Folge stören sich R58 und R163 räumlich, wodurch die Bildung der Signalhelix α 1 verhindert wird. Da in der Struktur mit Ligand die α 1-Helix nicht mehr für eine Dimerisierung zur Verfügung steht, erfolgt die Wechselwirkung über eine neue, durch α 2 und α 4 gebildete Interaktionsfläche. Diese liegt um 50° im Vergleich zur ursprünglichen Interaktionsfläche gedreht. In der Dimer-Form der Nlh1-GAF-Domäne mit Ligand ist keine Wechselwirkung mit der C-terminalen ATPase-Domäne mehr möglich. Diese heterologe Interaktion geht letztendlich durch Ligandenbindung verloren.

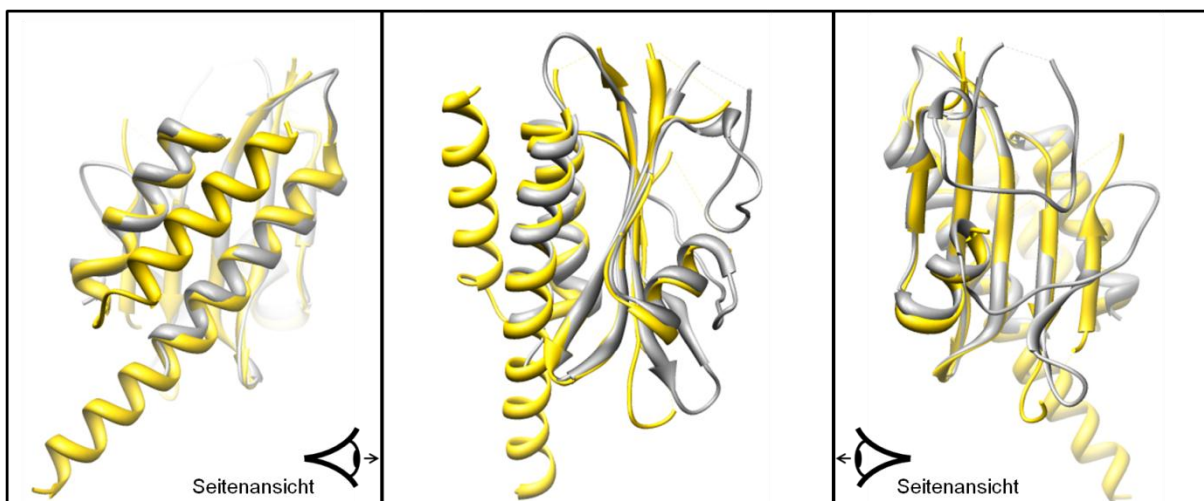


Abbildung 5.8: Überlagerung der GAF-Domäne von Nlh1 in der apo-Form (Nlh1-G1) und der Form mit gebundenem Liganden (Nlh1-G2). Die Kristallstrukturen von Nlh1-G1 in gelb (pdb: 4g3k) und Nlh1-G2 in grau (pdb: 4g3w; Batchelor *et al.*, 2013) wurden in monomerer Form mit dem Programm CHIMERA übereinandergelegt. Die Gesamtstruktur (Mitte) ist von rechts und links in Seitenansicht gezeigt.

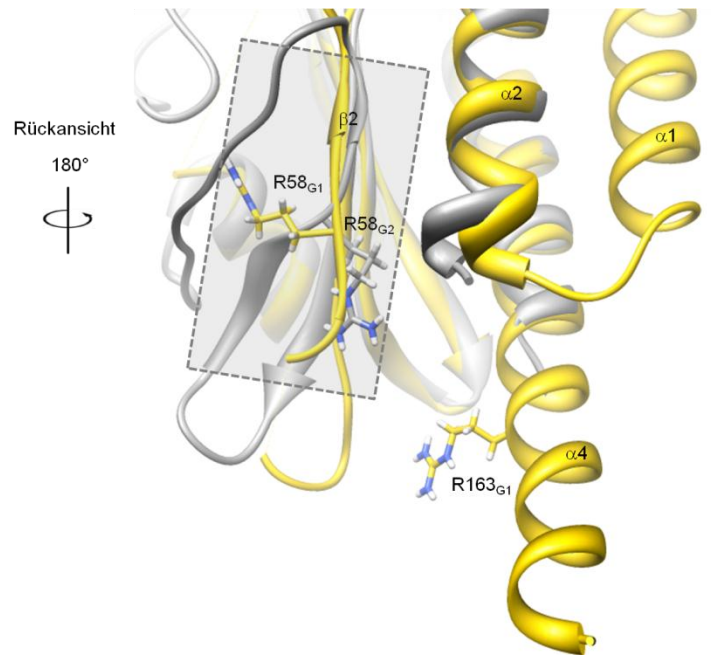


Abbildung 5.9: Detailansicht nach Überlagerung von der GAF-Domäne von Nih1 in der apo-Form (Nih1-G1) und der Form mit gebundenem Liganden (Nih1-G2). Die Kristallstrukturen von Nih1-G1 gelb (pdb: 4g3k) und Nih1-G2 grau (pdb: 4g3w; Batchelor *et al.*, 2013) wurden in monomerer Form mit dem Programm CHIMERA übereinandergelegt. Die Detailansicht entspricht der Rückansicht von Abbildung 5.8. Hervorgehoben sind die Reste R163 der α 4-Helix und der R58 des β 2-Faltblatts von Nih1-G1 und das gedrehte β 2-Faltblatt mit neuer Position des R58-Restes von Nih1-G2.

Die Triebkraft der Konformationsänderung ist die thermodynamische Stabilität der ligandengebundenen Form. Für CodY wurde beispielsweise der Zustand mit Ligand mit einer um 20 °C höheren Schmelztemperatur beschrieben (Levdikov *et al.*, 2009). Gleiches wurde für die GAF-A-Domäne der Phosphodiesterase PDE6 gezeigt (cGMP-gebundene Form mit ca. 20 °C höherem Schmelzpunkt; Heikaus *et al.*, 2008). Dies könnte für NreA mit gebundenem Nitrat ebenfalls zutreffen, sodass die monomere Form mit Nitrat stabiler ist als die ligandenfreie, dimere Form.

Konformationsänderungen und daraus resultierende Veränderungen von Interaktionsflächen sind bei GAF-Domänen also häufig zu finden. Dadurch können sich die Bindungseigenschaften an andere Proteine verändern, was ebenfalls eine Voraussetzung für eine regulatorische Funktion darstellt. Ein ligandenabhängiger Wechsel eines GAF-Domänen-Proteins zwischen dimerem und monomerem Zustand, wie er offenbar bei NreA der Fall ist, ist ein bislang nicht bekannter Mechanismus.

5.5.3 Mögliche Flächen von NreA zur Proteininteraktion

Die Konformationsänderungen von GAF-Domänen, die mit der Ligandenbindung einhergehen, sind unterschiedlich stark ausgeprägt. Dabei muss sich nicht die gesamte Oberfläche komplett ändern, sondern die Verschiebungen können räumlich begrenzt sein. Für NreA bedeutet dies, dass Interaktionsflächen für NreA/NreA- und NreA/NreB-Wechselwirkungen nicht aus der Kristallstruktur von monomerem NreA[NO₃⁻] zu berechnen sind. Vermutlich sind

jedoch die Reste, die für die spezifischen Wechselwirkungen nötig sind, konservierter als andere. Deshalb wurden die Reste des Multiplen Alignments (vgl. Abbildung 4.4) entsprechend ihrer Konservierung auf der NreA-Oberfläche in verschiedenen Graustufen eingefärbt (Abbildung 4.10). Anhäufungen mit mehr oder weniger starker Konservierung lassen auf Bereiche für Interaktionen schließen.

Die konservierten Bereiche auf der Proteinoberfläche sind verstärkt in zwei Bereichen gruppiert, die in der Abbildung durch die blaue und die rote Fläche hervorgehoben sind. Möglicherweise ist eine Fläche für eine NreA/NreA-Interaktion und die andere Fläche für eine NreA/NreB-Interaktion nötig.

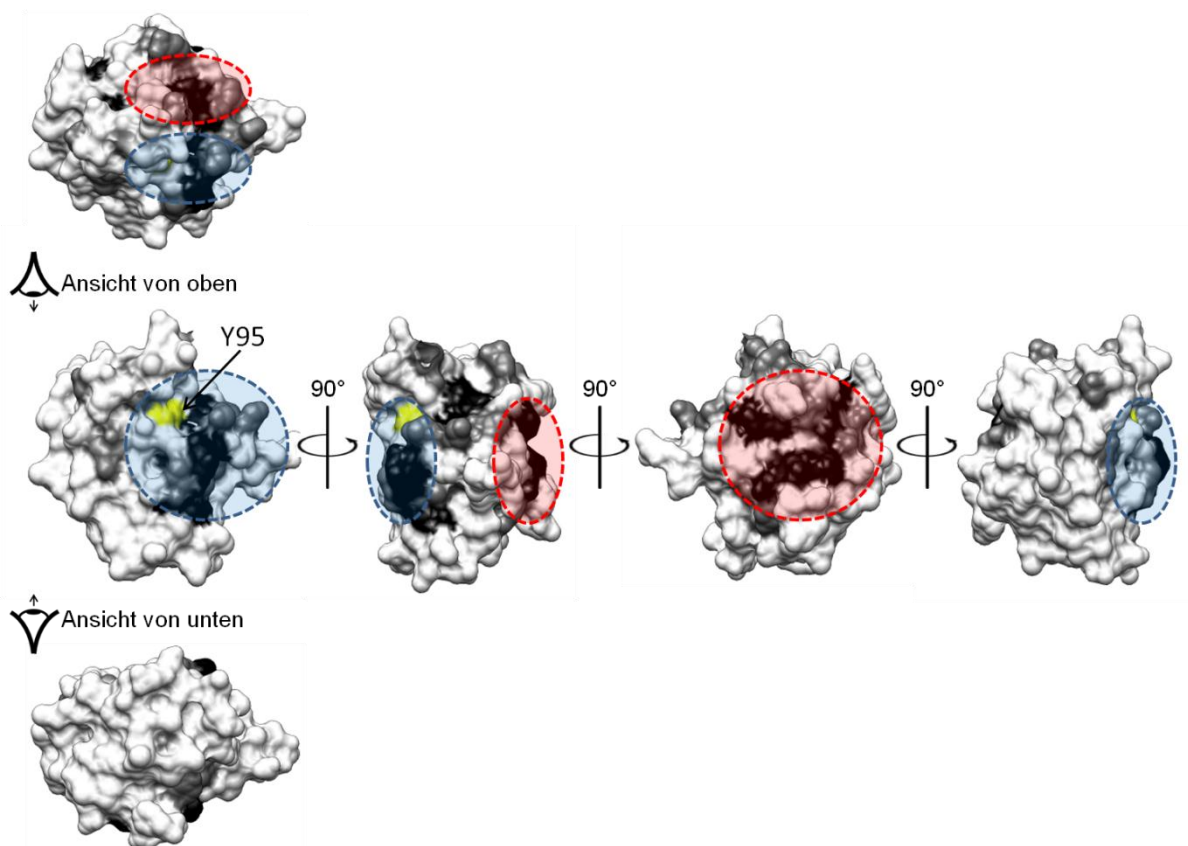


Abbildung 4.10: Oberflächendarstellung des NreA-Kristalls aus verschiedenen Blickwinkeln mit Einfärbung der konservierten Reste. Auf Basis des Multiplen Alignments von NreA und Homologen (vgl. Abbildung 4.4), wurden die Aminosäurereste in Abhängigkeit des Konservierungsgrades eingefärbt. Die Kolorierung von weiß bis schwarz zeigt keine bis starke Konservierung an. Der Rest Y95 ist gelb eingefärbt. In etwa 90°-Drehungen ist NreA aus verschiedenen Blickwinkeln gezeigt, sowie in den Ansichten von oben und von unten.

5.6 Mutationen in NreA betreffen Ligandenbindung, Konformationsänderung und Signalweitergabe der regulatorischen Funktion

Die Vergleiche von NreA mit anderen regulatorischen GAF-Domänen lassen vermuten, dass die Bindung von Nitrat eine veränderte Konformation induziert. Die nitratbindende Form bildet weder Homodimere noch wirkt sie durch Interaktion mit NreB reprimierend. Veränderungen von einzelnen Aminosäuren in NreA sollten sich mehr oder weniger stark

darauf auswirken, wie Ligandenbindung, Konformationsänderung und Interaktion mit NreB ablaufen können.

Mutationen, die direkt die Bindungstasche betreffen, beeinflussen unmittelbar die Bindung von Nitrat, also die Wahrnehmung des externen Effektors. Veränderungen von anderen Resten können dazu führen, dass eine mögliche Konformationsänderung erleichtert oder erschwert wird. Im Extremfall erstarrt die NreA-Variante bildlich in einem der Zustände. Hierfür relevante Reste liegen beispielsweise an Positionen, die das Rückgrat des Proteins formen und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen oder andere Wechselwirkungen ausbilden. Zuletzt muss das durch die Bindung von Nitrat hervorgerufene Signal die Wechselwirkung mit NreB modulieren, was vorzugsweise durch Reste auf der Proteinoberfläche von NreA geschehen sollte.

Nach Identifizierung von konservierten Aminosäureresten anhand des Multiplen Alignments wurden 25 NreA-Varianten mit gerichteter Mutagenese erstellt und funktionell analysiert.

Sechs Mutationen betrafen direkt die Nitratbindetasche, die weiteren mutierten Reste lagen fernab der Bindetasche. Die NreA-Mutanten wurden klassifiziert in wildtypische NreA-Varianten, Δ NreABC/OFF-Phänotyp und Δ NreA/ON-Phänotyp.

5.6.1 Mutationen in der Nitratbindetasche von NreA

Die Varianten NreA(Y95A), NreA(W45A) und NreA(L67E) waren als Δ NreABC/OFF-Phänotypen permanent als Inhibitor aktiv. NreA(Y95L) zeigte nahezu wildtypischen Charakter, wobei der Nitratstimulus abgeschwächt war. NreA(W45F) zeigte einen wildtypischen Phänotyp und NreA(L67N) einen Δ NreA/ON-Phänotyp.

Aufgrund der oberflächenexponierten Lage des Restes Y95 wurde eine Funktion als Art Deckel über dem Bindungsraum vermutet. Dies lässt sich durch die Mutationen in NreA untermauern. Der Alanin-Rest der Variante NreA(Y95A) ist wesentlich kleiner als der Tyrosinrest, was dazu führen kann, dass Nitrat weniger gut in der Bindetasche gehalten wird. Da NreA(Y95A) zu einem völligen Verlust der Autophosphorylierungsaktivität von NreB führt (Nilkens *et al.*, 2013), muss die Mutation selbst einen Effekt haben und das *narG-lip*-Resultat kann nicht einzig auf die erhöhte Konzentration *in vivo* zurückzuführen sein. Interaktionsstudien der NreA(Y95A)-Mutante gaben hier leider keinen genaueren Aufschluss. Der fast wildtypische Phänotyp von NreA(Y95L) lässt sich so deuten, dass der größere, aliphatische Leucinrest die Funktion des Tyrosinrestes weitgehend übernehmen kann.

W45 ist ebenfalls bedeutend für die Funktion von NreA. Der Rest bildet eine Wasserstoffbrückenbindung vom Indolamid des Tryptophans zum Nitrat und positioniert dieses zwischen den beiden dipolaren Helices. Der wesentlich kleinere Alaninrest bewirkt eine Vergrößerung der Nitratbindetasche (Abbildung 5.11). Außerdem kann keine Wasserstoffbrücke zum Liganden ausgebildet werden. Nitrat wird dadurch wahrscheinlich

weniger effektiv gebunden und es resultiert folgerichtig der Δ NreABC/OFF-Phänotyp. Ersetzt man den Rest durch Phenylalanin, so folgt daraus die wildtypische NreA(W45F)-Variante, obwohl in Phenylalanin der Indolstickstoff zur Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung fehlt. Offensichtlich sind die restlichen Wasserstoffbrückenbindungen über L67, A68 und I97 zu Nitrat ausreichend um Nitrat zu fixieren, wenn sich der Ligand an der richtigen Stelle in der Tasche befindet.

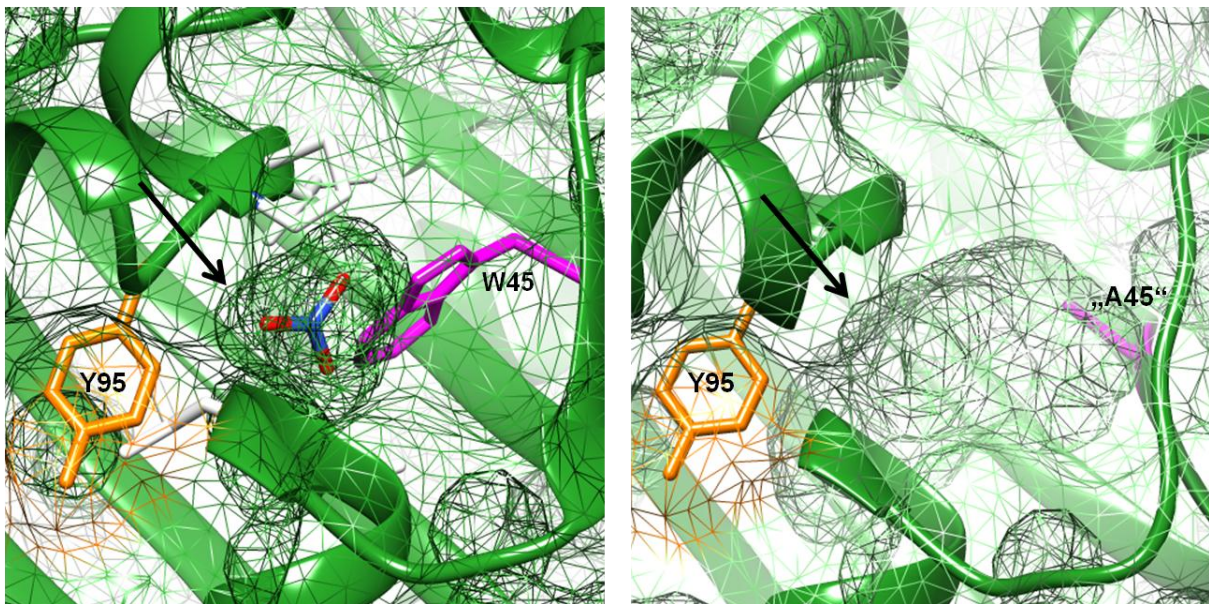


Abbildung 5.11: Darstellung der Bindetasche von Wildtyp-NreA und NreA(W45A) im Vergleich. Die Variante NreA(W45A) wurde basierend auf den Kristalldaten des Wildtyps mit SWISSMODEL vorhergesagt. Die Oberflächen in der Bindetasche sind netzartig angezeigt und die Reste Y95, W45 und „A45“ dargestellt. Die schwarzen Pfeile weisen auf die Oberfläche der Nitratbindetasche.

Die Substitution von L67 zu einem Glutamat- oder Glutaminrest zeigt entgegengesetzte Phänotypen. Der neutrale Rest L67 sitzt gegenüber von Y95 am Eingang der Bindetasche (Abbildung 5.12). Den Δ NreABC/OFF-Phänotyp von NreA(L67E) kann man damit erklären, dass Nitrat vom negativ geladenen Glutamatrest abgestoßen wird. Alternativ ist es möglich, dass der Glutamatrest mit Lysin K78 in der Nachbarschaft eine Salzbrücke bildet, welche eine Änderung zu einer offenen, nicht nitratbindenden Konformation nach sich zieht. Die strukturelle Ursache für den Δ NreA/ON-Phänotyp von NreA(L67N) kann sein, dass zwischen dem Glutaminrest und dem gegenüberliegenden Tyrosinrest Y95 eine weitere stabilisierende Wasserstoffbrücke gebildet werden kann, welche mit einer permanenten Änderung zu der geschlossenen, nitratbindenden Konformation einher geht.

In Abbildung 5.12 sind die Abstände von L67 zu benachbarten Resten in der nitrathaltigen NreA-Form gezeigt. Die Reste Glutamin und Glutamat sind um eine CH_2 -Gruppe länger als Leucin, sodass die angegebenen Distanzen bei den Mutanten geringer sein können.

Wasserstoffbrückenbindungen besitzen in der Regel Distanzen unter 2 Å und Salzbrücken sind noch etwas kürzer. Die Reste müssten sich demnach nur leicht zueinander neigen, um die vermuteten Bindungen zu bilden.

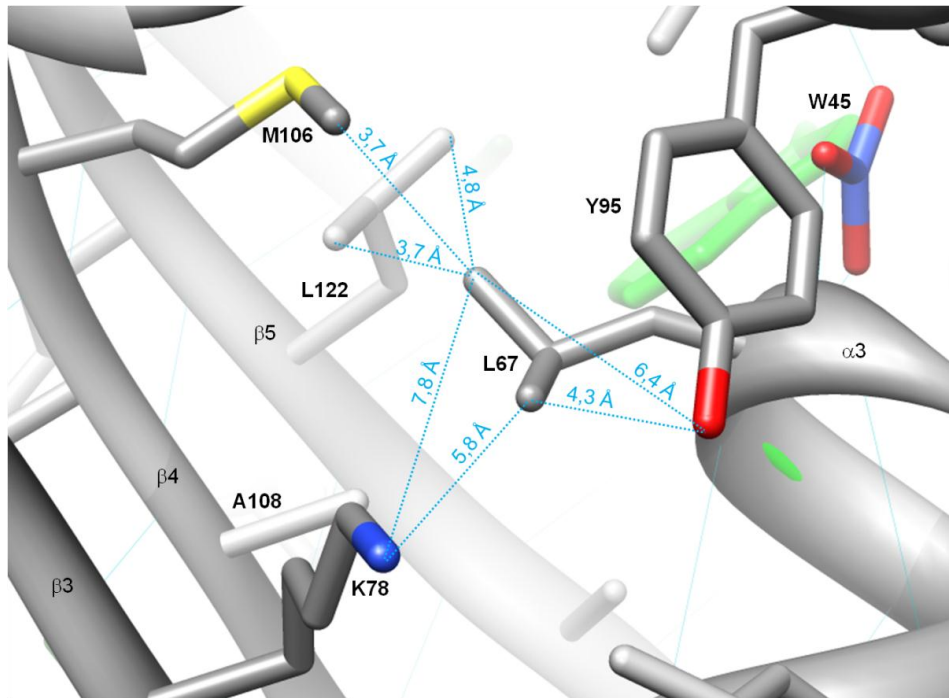


Abbildung 5.12: Darstellung der Abstände von L67 im nitrathaltigen NreA zu benachbarten Resten. Die Reste Y95, K78, L102 und M106 liegen in der Umgebung von L67. Die Abstände zueinander sind in blauen, gestrichelten Linien gezeigt. K78 und Y95 sind oberflächenexponiert. Im Hintergrund ist in grün der Rest W45 zu sehen, der bei der Nitratbindung beteiligt ist.

5.6.2 NreA-Mutationen in der Peripherie

19 Mutationen betrafen Reste, die nicht in der Bindetasche lagen. Es wurden nur drei wildtypische NreA-Varianten identifiziert, aber fünf mit Δ NreABC/OFF-Phänotyp und neun mit Δ NreA/ON-Phänotyp.

5.6.2.1 OFF-Mutanten hemmen NreBC dauerhaft durch Fixierung von NreA in der offenen, nitratfreien Konformation

Fünf NreA-Varianten besaßen einen Δ NreA/OFF-Phänotyp, NreA(R21A), NreA(Y47A), NreA(N51A), NreA(E101A) und NreA(L121S). Diese Reste dieser Mutationen sind nicht direkt an der Nitratbindung beteiligt. Sie führten zum Verlust der *narG-lip*-Expression unter anaeroben Bedingungen, da das Protein wahrscheinlich permanent als Repressor wirkt. In den NreA(R21A), NreA(Y47A), NreA(N51A) und NreA(E101A) fallen die Wasserstoffbrückenbindungen weg, die in wildtypischem NreA[NO₃] ausgebildet werden.

Bei Variante NreA(R21A) wurde zudem eine erhöhte Konzentration von NreA in der Zelle ermittelt. Der Δ NreABC/OFF-Phänotyp wird hierbei wahrscheinlich überwiegend durch die große Proteinmenge hervorgerufen, ähnlich wie es bei einer erhöhten Konzentration von

NreA im Vergleich zu NreBC beobachtet wurde (Wildtyp TM300 mit plasmidcodiertem NreA auf pMW1532, Nilkens *et al.*, 2013).

Der Δ NreABC/OFF-Phänotyp der NreA(L121S)-Variante kann mit der Beeinflussung des hydrophoben Kerns des Proteins durch den polaren Serinrest in Zusammenhang gebracht werden. Durch die Substitution des Restes wird möglicherweise das Gerüst der β -Faltblattstruktur gestört und es resultiert der Verlust der Fähigkeit der Signalverarbeitung durch Wechseln in den nicht-reprimierenden Konformationszustand.

5.6.2.2 ON-Mutanten verlieren ihre Repressorfunktion durch Blockierung von NreA in der nitratgebundenen Konformation oder Veränderung der Interaktionsfläche

Neben einer Beeinflussung der Konformationsänderung können durch die Mutationen auch intermolekulare Wechselwirkungen beeinträchtigt sein und den Δ NreA/ON-Phänotyp verursachen. Die Nachweise mit Anti-NreA-Serum zeigten, dass die Stabilität fast aller NreA-Varianten unbeeinflusst war. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die Nitratblindheit mit einhergehender aerober Derepression durch ein Nichtvorhandensein von NreA verursacht wurde. Festzuhalten bleibt aber, dass NreA(F28A) nicht und NreA(R126A) nur in geringer Konzentration *in vivo* vorhanden war.

Im Inneren des Proteins in der Nähe der Bindungstasche scheinen Mutationen (F28A, E101Q und L121S) die Konformation von nitratfreiem NreA nicht einzunehmen zu können oder indirekten Einfluss auf die Nitratbindung zu haben.

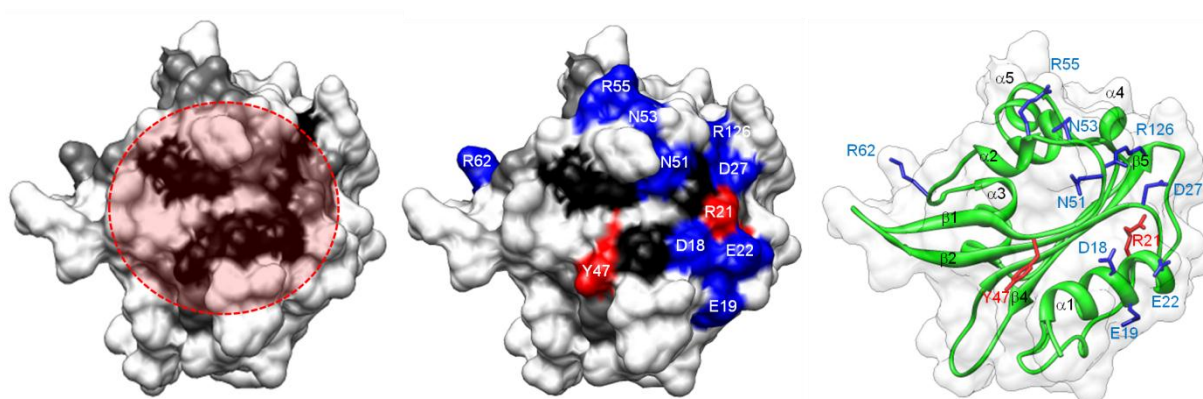


Abbildung 5.13: Oberflächendarstellung aus einem Blickwinkel des NreA-Kristalls mit Einfärbung der konservierten, sowie mutierten Reste. Auf Basis des erstellten Multiplen Alignments von NreA und Homologen (vgl. Abbildung 4.4), wurden die Aminosäurereste in Abhängigkeit des Konservierungsgrades eingefärbt. Die Kolorierung von weiß bis schwarz zeigt keine bis starke Konservierung an. Der Reste, welche nach Mutationen bei *narG-lip*-Studien einen Δ NreA/ON-Phänotyp ergaben, sind blau eingefärbt, die mit Δ NreABC/OFF-Phänotyp in rot.

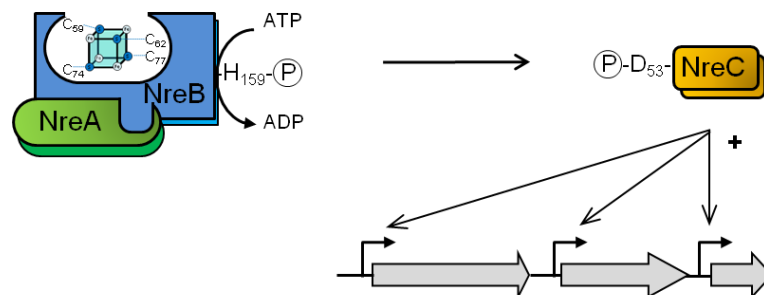
Der Δ NreA/ON-Phänotyp wurde bei den anderen Varianten durch Mutationen oberflächenexponierte Reste hervorgerufen (Abbildung 5.13), wobei einer der konservierten Bereiche betroffen war (rote Fläche). Vermutlich ist dieser Bereich für NreA/NreA- oder

NreA/NreB-Interaktionen wichtig. Die Veränderung von einzelnen Resten von neutral zu geladen (N51D und N53D), positiv zu neutral (R62A und R55A) oder negativ zu neutral (D27A) reicht scheinbar aus, dass eine Repressorfunktion bezüglich NreB nicht mehr ausgeübt werden kann. Ein möglicher Interaktionsverlust bei der NreA(D18N-E19Q-E22Q)-Variante korreliert mit BACTH-Studien einer $\Delta\alpha 1$ -Variante (Deletion der $\alpha 1$ -Helix von Aminosäure 12 bis 21), bei welcher sowohl die NreA/NreA- als auch die NreA/NreB-Interaktion verringert ist (Handel, 2013).

5.7 Modell zur Kontrolle der Funktion von NreBC durch NreA

Im NreABC-System stellt NreA den Nitratrezeptor, NreB den Sauerstoffsensoren und NreC den Antwortregulator dar (Abbildung 4.14). Nur in Sauerstoffabwesenheit verfügt NreB über das $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster und ist aktiv (Kamps *et al.*, 2004; Müllner *et al.*, 2008). NreB autophosphoryliert am His₁₅₉ und überträgt anschließend die Phosphorylgruppe auf Asp₅₃ von NreC. NreC-P induziert die Genexpression von *nirRBD*, *narGHJI* und *narT* (Fedtke *et al.*, 2004). NreA interagiert mit NreB in Abhängigkeit von Nitrat. Bei Nitratabwesenheit bindet das NreA-Dimer an das NreB-Dimer und bildet einen NreA/NreB-Komplex, wie *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden konnte (Abbildung 14A). Dies unterbindet die maximale Aktivität von NreB durch Hemmung der Kinaseaktivität (Nilkens *et al.*, 2013).

Anaerob
ohne Nitrat



Anaerob
mit Nitrat

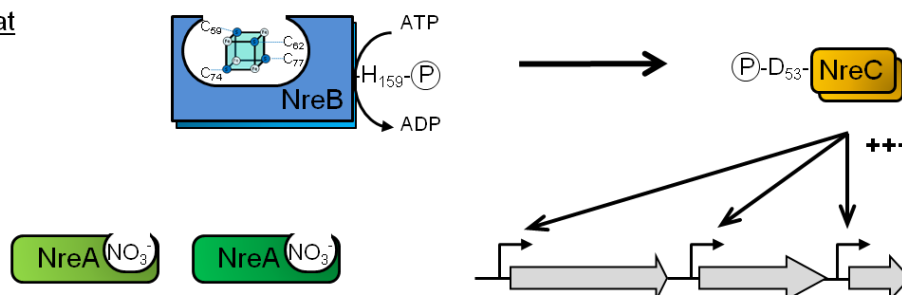


Abbildung 5.14: Modell zur Funktion von NreABC in der anaeroben Regulation der Nitratatmung. Der Nitratrezeptor NreA bindet in Abwesenheit von Nitrat an den Sauerstoffsensoren NreB. Die Phosphorylierungsaktivität von NreB ist gemindert und die Expression der Zielgene wird weniger induziert. Unter Nitratanwesenheit bindet NreA das Anion, zerfällt in Monomere und löst sich aus dem NreAB-Komplex. Freies, anaerobes NreB besitzt maximale Phosphorylierungsaktivität, sodass die Nitratatmungsgene stark induziert werden.

Bei Anwesenheit von Nitrat bindet NreA ein Molekül Nitrat in der Bindetasche (Abbildung 5.14B). Einhergehend mit einer reduzierten homologen Interaktion der NreA-Monomere, wie mit BACTH-Messungen nachgewiesen werden konnte, wird die NreA/NreB-Interaktion verändert und geht verloren. Dies führt zum Verlust der Drosselung der Kinaseaktivität von NreB (Nilkens *et al.*, 2013). NreB ist dann maximal aktiv und NreC induziert auf hohem Niveau die Genexpression, wie *in vivo* mit *narG-lip*-Reporterstudien gezeigt werden konnte. Nicht abgebildet ist die aerobe Situation, in der NreB ohne $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster in der inaktiven apoNreB-Form vorliegt (Müllner *et al.*, 2008). Die *narG-lip*-Expression ist aerob stark herunter reguliert.

Die Wahrnehmung von Sauerstoff und Nitrat verläuft in *S. carnosus* folglich absolut abweichend von der Wahrnehmung dieser beiden essentiellen Stimuli in *E. coli*. In *S. carnosus* ist das NreABC-System verantwortlich für die Registrierung von Sauerstoff und Nitrat. NreABC integriert beide Informationen über den NreA/NreB-Sensorkomplex zu einem Ausgangssignal auf Proteinebene für NreC. In *E. coli* verläuft diese Wahrnehmung in getrennten Systemen, die auf der Genebene zusammenlaufen, indem mehrere Antwortregulatoren an die Bindestellen der Promotoren binden. Nitrat wird über NarXL und Sauerstoff über FNR und ArcBA wahrgenommen und diese Informationen werden getrennt verarbeitet. Beiden Organismen gemeinsam ist die spezifische Feinregulation der Stoffwechselwege auf Transkriptionsebene, sodass der optimale Energiestoffwechsel in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen angeschaltet wird und eine maximale ATP-Ausbeute gewonnen werden kann.

Die Lösung von *S. carnosus*, beide Signale – Sauerstoff und Nitrat – in einem gemeinsamen Ausgangssignal zu verknüpfen, ist jedoch eine sehr elegante Methode.

6. Literatur

Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997)

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Journal of Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.

Anantharaman V., Koonin E. V., Aravind L. (2001)

Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains.

Journal of Molecular Biology, 307: 1271-1292.

Aravind L. und Ponting C. P. (1997)

The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins.

Trends in Biochemical Science 22: 458-459.

Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. (2006)

The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling.

Journal of Bioinformatics 22: 195-201.

Asen I., Djuranovic S., Lupas A. N., Zeth K. (2009)

Crystal structure of SpoVT, the final modulator of gene expression during spore development in *Bacillus subtilis*.

Journal of Molecular Biology 386: 962-975.

Batchelor J. D., Lee P. S., Wang A. C., Doucleff M., Wemmer D. E. (2013)

Structural mechanism of GAF-regulated σ^{54} activators from *Aquifex aeolicus*.

Journal of Molecular Biology 425: 156-170.

Becker K., Bierbaum G., von Eiff C., Engelmann S., Götz F., Hacker J., Hecker M., Peters G., Rosenstein R., Ziebuhr W. (2007)

Understanding the physiology and adaptation of staphylococci: a post-genomic approach.

International Journal of Medical Microbiology 297: 483-501.

Bekker M., Alexeeva S., Laan W., Sawers G., de Mattos J. T., Hellingwerf K. (2009)

The ArcBA Two-Component System of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool.

Journal of Bacteriology 192: 746-754.

Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. (2000)

The Protein Data Bank.

Nucleic acids research 28: 235-242.

Bertani, G. (1951)

Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*.

Journal of Medical Microbiology, 62: 293-300.

Boudes M., Lazar N., Graille M., Durand D., Gaidenko T. A., Stewart V., van Tilbeurgh H. (2012)

The structure of the NasR transcription antiterminator reveals a one-component system with a NIT nitrate receptor coupled to an ANTAR RNA-binding effector.

Molecular microbiology 85: 431-444.

Bradford M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding.
Journal of Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Brekasis D. und Paget M. S. (2003)

A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2).
EMBO Journal 22: 4856-4865.

Brückner R. (1992)

A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*.
Gene 122: 187-192.

Bruder S., Linder J. U., Martinez S. E., Zheng N., Beavo J. A., Schultz J. E. (2005)

The cyanobacterial tandem GAF domains from the *cyb2* adenylyl cyclase signal via both cAMP-binding sites.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 3088-3092.

Cheung J. und Hendrickson W. A. (2009)

Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX.
Structure 17: 190-201.

Essen L. O., Mailliet J., Hughes J. (2008)

The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 14709-14714.

Fast B., Lindgren P., Götz F. (1996)

Cloning, sequencing, and characterization of a gene (*narT*) encoding a transport protein involved in dissimilatory nitrate reduction in *Staphylococcus carnosus*.
Archives of Microbiology 166: 361-367.

Fedtke I., Kamps A., Krismer B., Götz F. (2002)

The nitrate reductase and nitrite reductase operons and the *narT* gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC.
Journal of Bacteriology 184: 6624-6634.

Goldberg J. M., Bosgraaf L., Van Haastert P. J. M., Smith J. L. (2002)

Identification of four candidate cGMP targets in *Dictyostelium*.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 6749-6754.

Götz F. und Schleifer K.H. (1983)

Staphylococcus carnosus and its use in gene technology.
Fleischwirtschaft 63: 1758-1760.

Götz F. und Schuhmacher B. (1987)

Improvement of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*.
FEMS Microbiology Letter 40: 285-288.

Gunsalus R. P. (1992)

Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes.
Journal of Bacteriology 174: 7069-7074.

- Green J., Trageser M., Six S., Uden G., Guest J. R. (1991)**
Characterization of the FNR protein of *Escherichia coli*, an iron-binding transcriptional regulator.
Proceedings of the royal society, Biological Science, 244: 137-144.
- Green J., Crack J. C., Thomson A. J., LeBrun N. E. (2009)**
Bacterial sensors of oxygen.
Journal of Current Opinion in Microbiology 12: 145-151.
- Gruez, A., Libiad, M., Boschi-Muller, S., Branlant, G. (2010)**
Structural and biochemical characterization of free methionine-R-sulfoxide reductase from *Neisseria meningitidis*.
Journal of Biological Chemistry 285: 25033-25043.
- Graf S., Schmieden D., Tauschner K., Hunke S., Uden G. (2013)**
The sensor kinase DctS forms a tripartite sensor unit with DctB and DctA for sensing C₄-dicarboxylates in *B. subtilis*.
Manuskript eingereicht.
- Guex N. und Peitsch M. C. (1997)**
SWISS-MODEL and the Swiss-pdbViewer: an environment for comparative protein modeling.
Journal of Electrophoresis 18: 2714-2723.
- Handa N., Mizohata E., Kishishita S., Toyama M., Morita S., Uchikubo-Kamo T., Akasaka R., Omori K., Kotera J., Terada T., Shirouzu M., Yokoyama S. (2008)**
Crystal structure of the GAF-B domain from human phosphodiesterase 10A complexed with its ligand, cAMP.
Journal of Biological Chemistry 283: 19657-19664.
- Handel S. (2013, Diplomarbeit)**
Das Dreikomponentensystem NreABC – Dimerisierungs- und Expressionsstudien an *Staphylococcus carnosus* NreA.
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Heikaus C. C., Pandit J., Klevit R. E. (2009)**
Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights.
Structure 17: 1551-1557.
- Ho Y. S., Burden L. M., Hurley J. H. (2000)**
Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor.
EMBO Journal 19: 5288-5299.
- Huang D., Hinds T. R., Martine S. E., Doneanu C, Beavo J. A. (2004)**
Molecular Determinants of cGMP binding to chicken cone photoreceptor phosphodiesterase.
Journal of Biology Chemistry 279: 48143-48151.
- Hübschmann T., Börner T., Hartmann E., Lamparter T. (2001)**
Characterization of the Cph1 holo-phytochrome from *Synechocystis sp.* PCC 6803.
European Journal of Biochemistry 268: 2055-2063.

Iuchi S. und Lin E. C. (1988)

arcA (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85: 1888-1892.

Kamps A., Achebach S., Fedtke I., Unden G., Götz F. (2004)

Staphylococcal NreB: An O₂-sensing histidine protein kinase with an O₂-labile iron-sulphur cluster of the FNR type.

Molecular microbiology 52: 713-723.

Karimova G., Pidoux J., Ullmann A., Ladant D. (1998)

A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 5752-5756.

Karimova G., Dautin N., Ladant D. (2005)

Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis.

Journal of Bacteriology 187: 2233-2243.

Klockenbusch C. und Kast J. (2010)

Optimization of Formaldehyde Cross-Linking for Protein Interaction Analysis of Non-Tagged Integrin β 1.

Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010: 1-13.

Koropatkin N. M., Pakrasi H. B., Smith T. J. (2006)

Atomic structure of a nitrate-binding protein crucial for photosynthetic productivity.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 9820-9825.

Krismer B. (1999, Dissertation)

Studium der Funktion der sekretierten Proteine SceA und SceB, Analyse des Galaktose-operons *galRKET* und Konstruktion von Sekretions- und Expressionsvektoren in *Staphylococcus carnosus*.

Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät der Biologie.

Krissinel E. und Henrick K. (2007)

Inference of macromolecular assemblies from crystalline state.

Journal of Molecular Biology 372: 774-797.

Laemmli U. K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227: 680-685.

Levdikov V. M., Blagova E., Joseph P., Sonenshein A. L., Wilkinson A. J. (2006)

The structure of CodY, a GTP- and isoleucine-responsive regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria.

Journal of Biological Chemistry 281: 11366-11373.

Levdikov V. M., Blagova E., Colledge V. L., Lebedev A. A., Williamson D. C., Sonenshein A. L., Wilkinson A. J. (2009)

Structural rearrangement accompanying ligand binding in the GAF domain of CodY from *Bacillus subtilis*.

Journal of Molecular Biology 390: 1007-1018.

- Lin Z., Johnson L. C., Weissbach H., Brot N., Lively M. O., Lowther W. T. (2007)**
Free methionine-(R)-sulfoxide reductase from *Escherichia coli* reveals a new GAF domain function.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 9597-9602.
- Little R. und Dixon R. (2003)**
The amino-terminal GAF domain of *Azobacter vinelandii* NifA binds 2-Oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions.
Journal of Biological Chemistry 278: 28711-28718.
- Löfblom J., Kronqvist N., Uhlén M., Ståhl S., Wernérus H. (2007)**
Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism.
Journal of Applied Microbiology 102: 736-747.
- Ma X., Guo P., Chen Y., Zhou C. (2009)**
Crystal structure of yeast free methionine-r-sulfoxide reductase Ykg9 in complex with the substrate.
Structure Summary MMDB; Protein Data Bank, Europa.
- Margulies E. H., Blanchette M., NISC Comparative Sequencing Program, Haussler D., Green E. D. (2003)**
Identification and Characterization of Multi-Species Conserved Sequences.
Journal of Genome Research 13: 2507-2518.
- Martinez S. E., Beavo J. A., Hol W. G. (2002)**
GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides.
Journal of Molecular Intervention 2: 317-323.
- Martinez S. E., Wu A. Y., Glavas N. A., Tang X.-B., Turley S., Hol W. G. J., Beavo J. A. (2002b)**
The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 13260-13265.
- Martinez S. E., Bruder S., Schultz A., Zheng N., Schultz J. E., Beavo J. A., Linder J. U. (2005)**
Crystal structure of the tandem GAF domains from a cyanobacterial adenylyl cyclase: modes of ligand binding and dimerization.
Journal of Proceedings of the National Academy of Science USA 102: 3082-3087.
- Martinez S. E., Heikaus C. C., Klevit R. E., Beavo J. A. (2008)**
The structure of the GAF A domain from phosphodiesterase 6C reveals determinants of cGMP binding, a conserved binding surface, and a large cGMP-dependent conformational change.
Journal of Biological Chemistry 283: 25913-25919.
- McAllister-Lucas L. M., Haik T. L., Colbran J. L., Sonnenburg W. K., Seger D., Turko I. V., Beavo J. A., Francis S. H., Corbin J. D. (1995)**
An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase.
Journal of Biological Chemistry 270: 30671-30679.

- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986)**
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Biotechnology 24: 17-27.
- Müllner M. (2008, Dissertation)**
Biochemische Charakterisierung des O₂-Sensors NreB aus *Staphylococcus carnosus*.
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Müllner M., Hammel O., Mienert B., Schlag S., Bill E., Uden G. (2008)**
A PAS domain with an oxygen labile [4Fe-4S]²⁺ cluster in the oxygen sensor kinase NreB of *Staphylococcus carnosus*.
Journal of Biochemistry 47: 13921-13932.
- Neubauer H. und Götz F. (1996)**
Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*.
Journal of Bacteriology 178: 2005-2009.
- Neubauer H., Pantel I., Götz F. (1998)**
Characterization of *moeB*-part of the molybdenum cofactor biosynthesis gene cluster in *Staphylococcus carnosus*.
FEMS Microbiology letters 164: 55-62.
- Neubauer H., Pantel I., Götz F. (1999)**
Molecular characterization of the nitrite-reducing system of *Staphylococcus carnosus*.
Physiology Journal of Bacteriology 181: 1481-1488.
- Niemann V., Koch-Singenstreu M., Nilkens S., Götz F., Uden G., Stehle T. (2013)**
The NreA protein functions as a nitrate receptor in the staphylococcal nitrate regulation system.
Manuskript eingereicht.
- Nilkens S., Koch-Singenstreu M., Niemann V., Götz F., Stehle T., Uden G. (2013)**
Nitrate/oxygen co-sensing by an NreA/NreB sensor complex of *Staphylococcus carnosus*.
Manuskript eingereicht.
- Nilkens S. (2013, Dissertation)**
The NreABC system of *Staphylococcus carnosus* combines nitrate and oxygen sensing by an NreA/NreB sensor complex.
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Pantel I., Lindgren P.-E., Neubauer H., Götz F. (1998)**
Identification and characterization of the *Staphylococcus carnosus* nitrate reductase operon.
Journal of Molecular and General Genetic 259: 105-114.
- Parowatkin M. (2012, Diplomarbeit)**
Charakterisierung der Sensorkinase CitA aus *Geobacillus thermodenitrificans*.
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Partch C. L. und Gardner K. H. (2010)**
Coactivator recruitment: a new role for PAS domains in transcriptional regulation by the bHLH-PAS family.
Journal of Cellular Physiology 223: 553-557.

Peschel A., Augustin J., Kupke T., Stevanovic S., Götz F. (1993)

Regulation of epidermin biosynthetic genes by EpiQ.
Journal of Molecular Microbiology 9: 31-39.

Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. (2004)

UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis.
Journal of Computational Chemistry 25: 1605-1612.

Pietrokovski S. (1996)

Searching databases of conserved sequence regions by aligning protein multiple-alignments.
Nucleic Acids Research 24: 3836-3845.

Podust L. M., Ioanoviciu A., Ortiz de Montellano P. R. (2008)

2.3 Å X-ray structure of the heme-bound GAF domain of sensory histidine kinase DosT of *Mycobacterium tuberculosis*.
Journal of Biochemistry 47: 12523-12531.

Ponting C. P. und Aravind L. (1997)

PAS: a multifunctional domain family comes to light.
Journal of Current Biology 7: 674-677.

Pragman A. A., Yarwood J. M., Tripp T. J., Schlievert P. M. (2004)

Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*.
Journal of Bacteriology 186: 2430-2438.

Razeto A., Ramakrishnan V., Litterst C. M., Giller K., Griesinger C., Carlomagno T., Lakomek N., Heimbürg T., Lodrini M., Pfitzner E., Becker S. (2004)

Structure of the NCoA-1/SRC-1 PAS-B domain bound to the LXXLL motif of the STAT6 transactivation domain.
Journal of Molecular Biology 336: 319-329.

Reinhart F. (2010, Dissertation)

The Oxygen Sensors FNR from *Escherichia coli* and NreABC from *Staphylococcus carnosus*.
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.

Rosenstein R., Peschel A., Wieland B., Götz F. (1992)

Expression and regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosum* plasmid pSX267.
Journal of Bacteriology 174: 3676-3683 .

Rosenstein R., Nerz C., Biswas L., Resch A., Raddatz G., Schuster S. C., Götz F. (2009)

Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300.
Journal of Applied and Environmental Microbiology 75: 811-822.

Sambrook J. und Russell D. W. (2001)

Molecular cloning: a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schlag S. (2008, Dissertation)

Dissimilatory nitrate and nitrite reduction in staphylococci: regulation and implication in biofilm formation.

Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät der Microbial Genetics.

Schlag S., Fuchs S., Nerz C., Gaupp R., Engelmann S., Liebeke M., Lalk M., Hecker M., Götz F. (2008)

Characterization of the oxygen-responsive NreABC regulon of *Staphylococcus aureus*.
Journal of Bacteriology 190: 7847-7858.

Schleifer K. H. und Fischer U. (1982)

Description of a new species of the genus *Staphylococcus carnosus*.
International Journal of Systematic Bacteriology 32: 152-156.

Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M. C. (2003)

SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server.
Journal of Nucleic Acids Research 31: 3381-3385.

Scheu P. D., Kim O. B., Griesinger C., Uden G. (2010)

Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: exogenous versus endogenous sensing of C₄-dicarboxylats in bacteria.
Future Microbiology 5: 1382-1402.

Shaw D. J. und Guest J. R. (1982)

Amplification and product identification of the *fnr* gene of *Escherichia coli*.
Journal of General Microbiology 128: 2221-2228.

Singenstreu M. (2010, Diplomarbeit)

Charakterisierung von NreA des Trikomponentensystems NreABC aus *Staphylococcus carnosus*.

Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.

Stein A. J., Mack J., Buck K., Joachimiak A. (2010)

The crystal structure of the gaf domain of a two-component sensor histidine kinase from *Bacillus halodurans* to 2.45Å.

Structure Summary MMDB; Protein Data Bank, Europa.

Taylor B. L. und Zhulin I. B. (1999)

PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light.
Microbiology and Molecular Biology Reviews 63: 479-506.

Throup J. P., Zappacosta F., Lunsford R. D., Annan R. S., Carr S. A., Lonsdale J. T., Bryant A. P., McDevitt D., Rosenberg M., Burnham M. K. R. (2001)

The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function.

Journal of Biochemistry 40: 10392-10401.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76: 4350-4354.

Turko I. V., Haik T. L., McAllister-Lucas L. M., Burns F., Francis S. H., Corbin J. D. (1996)

Identification of key amino acids in a conserved cGMP-binding site of cGMP-binding phosphodiesterases.

Journal of Biological Chemistry 271: 22240-22244.

Ulrich M., Bastian M., Cramton S. E., Ziegler K., Pragman A. A., Bregonzi A., Memmi G., Wolz C., Schlievert P. M., Cheung A., Döring G. (2007)

The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces *ica* gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions.
Journal of Molecular Microbiology 65: 1276-1287.

Uden, G. und Bongaerts, J. (1997)

Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors.
Biochimica et Biophysica Acta 1320: 217-234.

Uden G. und Schirawski J. (1997)

The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions.
Molecular Microbiology 25: 205-210.

Uden G. und Trageser M. (1991)

Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: control of anaerobic respiration by the FNR protein.
Antonie Van Leeuwenhoek 59: 65-76.

Uden G., Müllner M., Reinhart F. (2010)

Sensing of Oxygen by Bacteria.
Bacterial Signaling, Kapitel 16.

Uden, G., Nilkens, S., Singenstreu, M. (2013)

Bacterial sensor kinases using Fe-S cluster binding PAS or GAF domains for O₂ sensing.
Dalton Transactions 42: 3082-3087.

Uden G. (2013)

Energy transduction in anaerobic bacteria.
Encyclopedia of Biological Chemistry 2: 204-209.

Vos M. H., Bouzhir-Sima L., Lambry J.-C., Luo H., Eaton-Rye J. J., Ioanoviciu A., Ortiz de Montellano P. R., Liebl U. (2012)

Ultrafast ligand dynamics in the heme-based GAF sensor domains of the histidine kinases DosS and DosT from *Mycobacterium tuberculosis*.
Biochemistry 51: 159-166.

Wagner E., Doskar J., Götz F. (1998)

Physical and genetic map of genome of *Staphylococcus carnosus* TM300.
Journal of General Microbiology 144: 509-517.

Westbrook J., Feng Z., Chen L., Yang H., Berman H.M. (2003)

The Protein Data Bank and structural genomics.
Journal of Nucleic Acid Research 31: 489-491.

Wieland, K. P., Wieland, B., Götz, F. (1995)

A promoter-screening plasmid and xylose-inducible, glucose-repressible expression vectors for *Staphylococcus carnosus*.
Gene 158: 91-96.

Williams, S. B. und Stewart, V. (1997)

Discrimination between structurally related ligands nitrate and nitrite controls autokinase activity of the NarX transmembrane signal transducer of *Escherichia coli* K-12.
Journal of Molecular Biology 26: 911-925.

Witan J. (2012, Dissertation)

Funktion der C₄-Dicarboxylat-Transporter DctA und DcuB als Co-Sensoren von DcuS in *Escherichia coli*.
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.

Wu A. Y., Tang X. B., Martinez S. E., Ikeda K., Beavo J. A. (2004)

Molecular determinants for cyclic nucleotide binding to the regulatory domains of phosphodiesterase 2A.
Journal of Biological Chemistry 279: 37928-37938.

Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985)

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene 33: 103-119.

Yeh K. C., Wu S. H., Murphy J.T., Laqarias J. C. (1997)

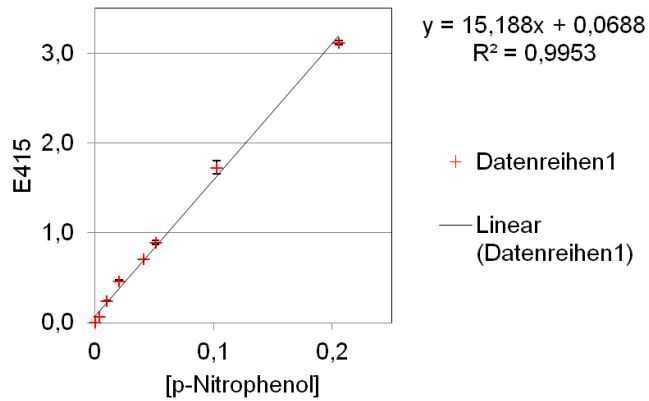
A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system.
Science 277: 1505-1508.

Zoraghi R., Corbin J. D., Francis S. H. (2004)

Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins.
Molecular pharmacology 65: 267-278.

Anhang

[pNP]	E_{415}	E_{415-BW}	Stabw.
0	0,038	-0,003	0,001
0,000411	0,045	0,005	0,001
0,00411	0,113	0,073	0,001
0,010275	0,286	0,246	0,006
0,02055	0,507	0,467	0,006
0,0411	0,754	0,714	0,001
0,051375	0,934	0,894	0,025
0,10275	1,771	1,731	0,071
0,2055	3,156	3,116	0,022
Stammlösung = 0,411 mM			



RT

pH 9,0

415 nm

 $\epsilon = 15,188 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

Abbildung A.1: Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten mit *p*-Nitrophenol für die *narG-lip*-Reporterstudien. Die Eichgrade wurde bei Raumtemperatur und pH 9 mit einer Verdünnungsreihe einer *p*-Nitrophenollösung erstellt und bei einer Extinktion von 415 nm gemessen. Anhand der Eichgrade wurde der spezifische molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 15,188 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ berechnet. Determinationskoeffizient beträgt $R^2 = 0,9953$.

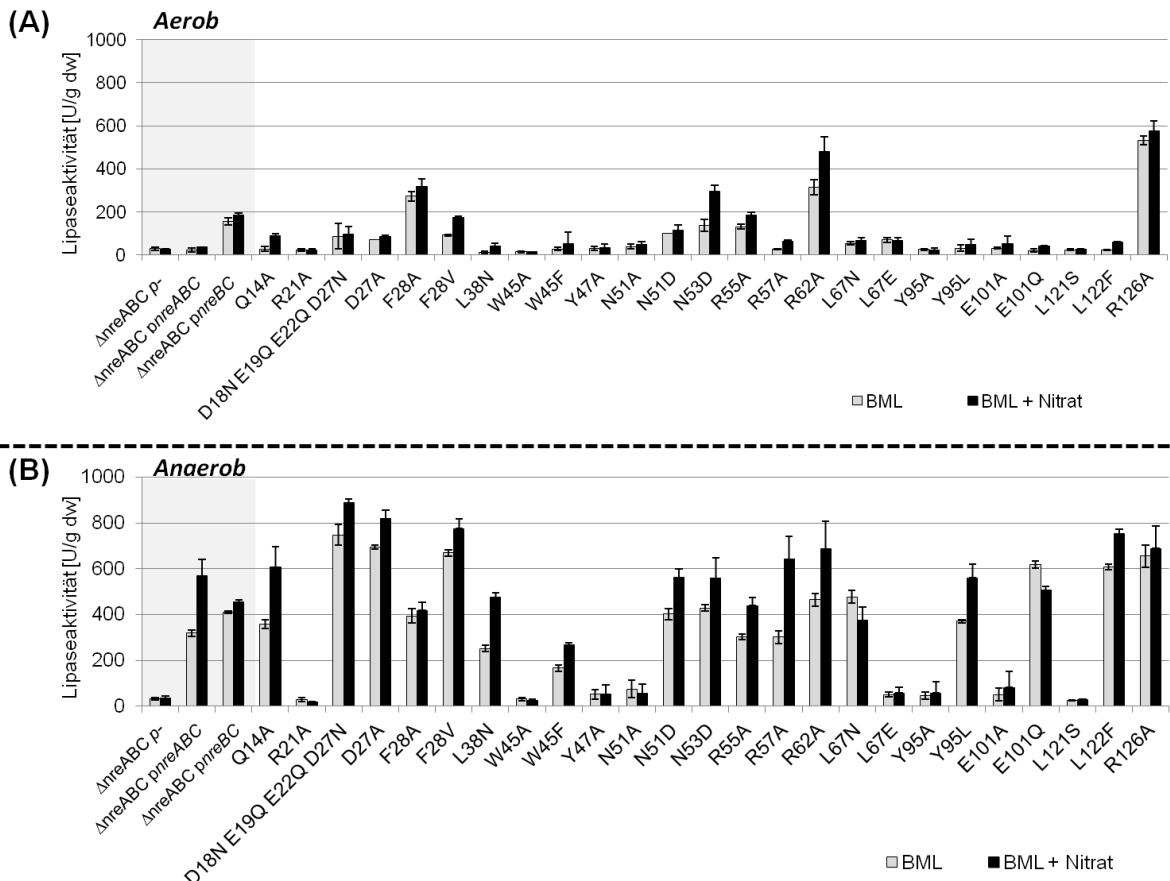


Abbildung A.2: Lipaseaktivität (*narG-lip* Expression) der Δ NreABC-Mutante, des NreABC-Wildtyps und der Δ NreA-Mutante und der NreA-Varianten in der Reihenfolge der Primärsequenz. Spezifische Lipaseaktivitäten unter aeroben (oben) und anaeroben (unten) Bedingungen sind dargestellt. Die Δ nreABC-Mutante m1 wurde mit den Plasmiden pMW1001 (*p*-), pMW1040 (*pnreABC*) und pMW1393 (*pnreBC*), oder pMW1040/1-Varianten (*pnreA*BC*) komplementiert. Graue Balken geben nitratfreie und schwarze Balken nitralhaltige (10 mM) Zuchten an.

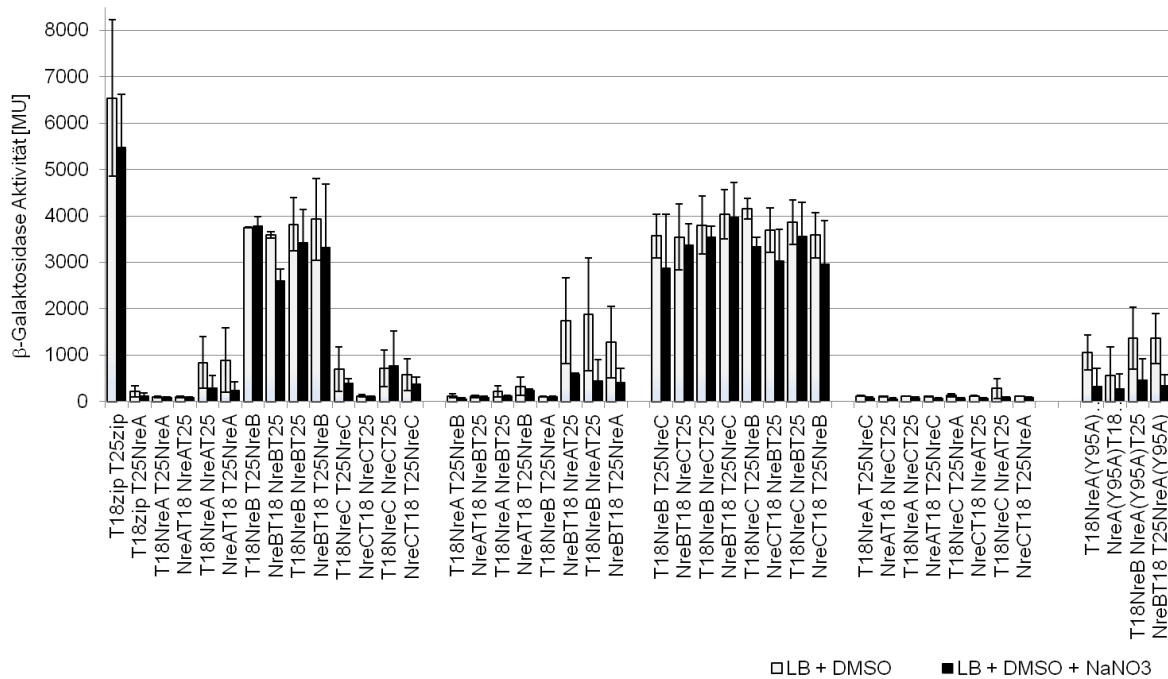


Abbildung A.3: Kontrollen für die Protein-Interaktionsstudien mit dem Bacterial Two-Hybrid System (BACTH) unter Anaerobie und alle möglichen Kombinationen des NreABC-Systems. Positive Interaktion wird durch refunctionalisierte Adenylatzyklase aus den Domänen T18 und T25 erreicht, hier durch Fusionen mit stark interagierenden Leucinzippern (Zip) zu T25-Zip und T18-Zip. Zur Festlegung der Hintergrundexpression von nicht-interagierenden Proteinen wurde das Expressionslevel des Paares T25-NreA und T18-zip verwendet und als Schwellenwert festgelegt. Zur Quantifizierung der Proteininteraktion wurde die β -Galaktosidaseaktivität bei einer OD₅₇₀ von 0,25 – 0,5 ermittelt und in [MU] angegeben. Weiße Balken zeigen β -Galaktosidaseaktivität nach nitratfreier, anaerober Zucht (30 °C, LB mit IPTG (0,5 mM), DMSO (20 mM), Ampicillin (10 μ g/ml), Kanamycin (50 μ g/ml)) an und schwarze Balken mit zusätzlich NaNO₃ (10 mM). Die Fläche unterhalb des Schwellenwertes ist hellblau hinterlegt.

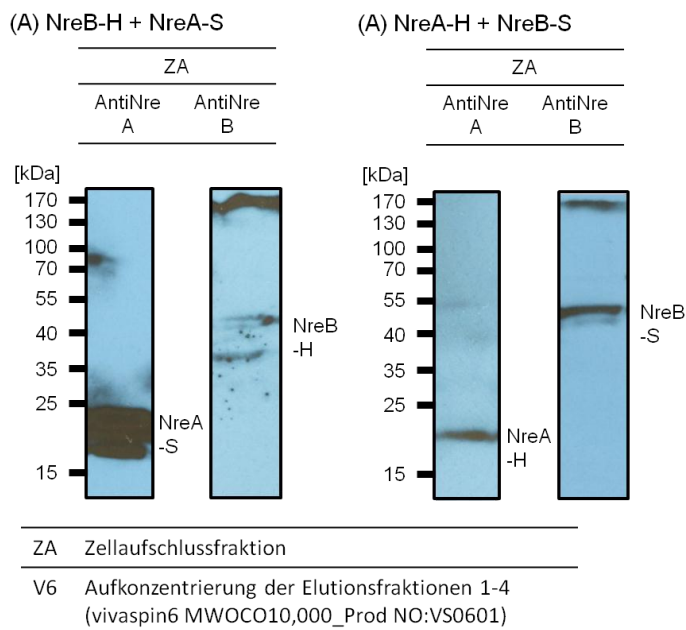


Abbildung A.4: Kontrolle des Zellaufschlusses der Proben der *in vivo* Bindungsstudien von NreA und NreB in *E. coli* von Abbildung 4.33. Für die Untersuchung der Bindung von NreA-Strep (NreA-S) an NreB-His (NreB-H) (A), sowie von NreB-Strep (NreB-S) an NreA-His (NreA-H) (B) und Co-Reinigung durch Nickel-NTA (HPINE) wurden NreA-S (pMW1243) und NreB-H (pMW1950), bzw. NreB-S (pMW1192) und NreA-H (pMW1949) in *E. coli* JM109 co-exprimiert. Nach Induktion der

Proteinexpression mit Anhydrotetracyclin (200 ng/ml; NreA-S, NreB-S) und Arabinose (0,01%; NreA-H, NreB-H) erfolgte zum chemischen Cross-Linking interagierender Proteine eine Formaldehyd Zugabe (0,6% (v/v)). NreA-H, bzw. NreB-H wurden mittels NTA-Säule gereinigt. Der Nachweis erfolgte mit spezifischem, polyklonalem Anti-NreA-, beziehungsweise Anti-NreB-Serum.

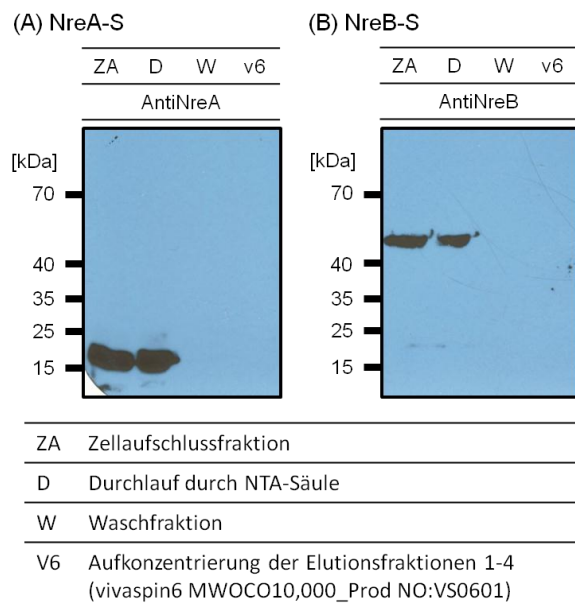


Abbildung A.5: Kontrolle der Bindung von Strep-tag Protein an Ni-NTA-Säule im Rahmen der *in vivo* Bindungsstudien von NreA und NreB in *E. coli*. Für die Untersuchung der Bindung von NreA-Strep (NreA-S) (A), sowie NreB-Strep (NreB-S) (B) an die Ni-NTA-Säule wurden NreA-S (pMW1243) bzw. NreB-S (pMW1192) in *E. coli* JM109 exprimiert. Nach Induktion der Proteinexpression mit Anhydrotetracyclin (200 ng/ml; NreA-S, NreB-S) und Arabinose (0,01%) erfolgte zum chemischen Cross-Linking interagierender Proteine eine Formaldehyd Zugabe (0,6% (v/v)). Anschließend wurde mit Nickel-NTA aufgereinigt. Der Nachweis erfolgte mit spezifischem, polyklonalem Anti-NreA-, beziehungsweise Anti-NreB-Serum.