

**Transkriptionskontrolle des *nuoA-N* Operons (NADH-
Dehydrogenase I) von *Escherichia coli***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg Universität
in Mainz

Yvonne Nicole Zeuner

geb. in Bad Kreuznach

Mainz, August 2002

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: **2002**

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
3. Material und Methoden	10
3.1 Verwendete Stämme von <i>Escherichia coli</i>	10
3.2 Medien und Zucht	15
3.3 Molekulargenetische Methoden	17
3.4 Biochemische Methoden	25
4. Ergebnisse	31
4.1 Expression und Transkriptionskontrolle durch zwei Promotoren	31
4.2 Spezifische Bindung von ArcA an die beiden ArcA-Bindestellen	35
4.3 Mutagenese der ArcA-Bindestellen	38
4.4 In vitro Transkription der beiden <i>nuo</i> -Promotoren	50
4.5 Glucoserepression von <i>nuo</i>	53
4.6 NarL abhängige Transkriptionskontrolle von <i>nuo</i>	55
5. Diskussion	61
5.1 Architektur des regulatorischen Bereichs vor <i>nuo</i>	61
5.2 Aufbau der ArcA-Bindestellen	63
5.3 Der ArcA-Konsensus	66
5.4 Transkriptionskontrolle der beiden <i>nuo</i> -Promotoren	69
5.5 Modell zur Expressionskontrolle des <i>nuoA-N</i> Operons	71
5.6 Glucoserepression, welches Protein ist daran beteiligt?	76
5.7 Funktion der beiden Palindrome im intergenischen Bereich vor <i>nuoA</i>	77
5.8 In vitro Transkription	79
5.9 NarL-Regulation des <i>nuoA-N</i> Operons	80
6. Veröffentlichungen	82
7. Literatur	83
. Anhang	

1. Zusammenfassung

Das Elektronentransportsystem von *E. coli* enthält zwei verschiedene NADH-Dehydrogenasen. Die NADH-Dehydrogenase I (*nuoA-N*) koppelt im Gegensatz zur NADH-Dehydrogenase II die Oxidation von NADH an eine Protonentranslokation und trägt zur Energiekonservierung bei. Das *nuoA-N*-Operon ist durch eine große intergenische Region gekennzeichnet. Die NADH-Dehydrogenase I wird über die beiden Promotoren P1 und P2 exprimiert und besitzt mehrere Bindestellen für verschiedene Regulatoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass beide Promotoren beim aeroben sowie anaeroben Wachstum einen unterschiedlichen Beitrag zur Expression leisten. Die separate Klonierung der Promotoren, transkriptionelle und translationelle *lacZ*-Fusionen, Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren, sowie die Nutzung mutierter Regulatorbindestellen *in vivo* zeigen, dass der Promotor P1 im wesentlichen die Expressionshöhe bestimmt. Er wird geringfügig durch den Transkriptionsregulator ArcA (aerobic respiration control) kontrolliert und ist unter aeroben und anaeroben Bedingungen aktiv. Der Promotor P2 trägt in wesentlich geringerem Maße als P1 zur Expression des Enzyms bei. Er ist stark abhängig von den Transkriptionsfaktoren ArcA und IHF (integration host factor). Der aus P1 und P2 zusammengesetzte Gesamtpromotor erreichte in seiner Expressionshöhe nicht den Wert des separaten Promotors P1 alleine. Somit wirken beide Promotoren in ihrer Leistung nicht additiv.

Unter anaeroben Bedingungen wird die Transkription von *nuo* durch das Zweikomponentensystem ArcB/A reprimiert. ArcA bindet unabhängige und mit unterschiedlicher Affinität an die beiden Bindestellen *arc1* und *arc2*. Von den 8 ArcA-Konsensussequenzen, von denen jeweils vier in den Bindestellen *arc1* und *arc2* lokalisiert sind, führen nur Mutationen der Konsensussequenzen *arc1ab in vitro* zu verminderter Bindungsaffinität von ArcA an die Bindestelle *arc1*. Dieselbe führt *in vivo* unter anaeroben Bedingungen zur Derepression des Promotors P1 bzw. P1+P2. Unter aeroben Bedingungen zeigen nur Mutationen in *arc2* eine Derepression, die nicht durch ArcA vermittelt wird. Der veröffentlichte ArcA-Konsensus scheint deshalb in dieser einfachen Form nicht gültig zu sein.

Beim Wachstum von *E. coli* auf Glucose als C-Quelle wird die Expression von *nuo* reprimiert. Die Glucoserepression ist nicht von den Regulatoren CRP/cAMP, Mlc und NagC abhängig. Im Promotorbereich von *nuo* wurden zwei ausgeprägte Palindrome identifiziert. Die Bedeutung dieser beiden Palindrome für die Regulation von *nuo* ist bisher ungeklärt.

2. Einleitung

Aufbau und Funktion der Elektronentransportkette

Die Elektronentransportkette des Enterobakteriums *Escherichia coli* besteht aus verschiedenen Dehydrogenasen und terminalen Reduktasen. Diese sind über membranassoziierte Elektronencarrier mit den Chinonen Ubichinon, Menachinon und Desmethylmenachinon verbunden. Sie können zur Energiekonservierung durch Elektronentransportphosphorylierung eine Vielzahl von Elektronendonoren und Elektronenakzeptoren nutzen. Neben Sauerstoff können auch Nitrat, Nitrit, Fumarat, DMSO (= Dimethylsulfoxid) oder TMAO (= Trimethylamin-N-oxid) als Elektronenakzeptoren verwendet werden. Bei diesen Elektronentransferreaktionen wird ein transmembranes Protonenpotential generiert, das z.B. zur ATP-Synthese, zum Transport von Kohlenstoffquellen oder zur Zellmotilität notwendig ist (Gunsalus, 1992; Uden *et al.*, 1994; Uden and Bongaerts, 1997).

Regulation und Expression

Die Expression der terminalen Reduktasen wird durch die An- bzw. Abwesenheit der Elektronenakzeptoren reguliert. Die Nutzung folgt einer strengen Hierarchie, bei der immer der elektropositivste Elektronenakzeptor bevorzugt wird, der in der Regel einen höheren H^+/e^- Quotienten hat und damit eine höhere ATP-Ausbeute ermöglicht. Sauerstoff ($E_0' = + 0,82$ V) ist dabei der bevorzugte Elektronenakzeptoren und reprimiert die Synthese aller Reduktasen der anaeroben Atmung. Nitrat, der elektropositivste Akzeptor unter anaeroben Bedingungen ($E_0' = + 0,43$ V) reprimiert den Elektronentransfer zu Fumarat ($E_0' = + 0,03$ V) oder DMSO ($E_0' = + 0,13$ V) und die Fermentation (Gunsalus, 1992; Uden *et al.*, 1994; Iuchi and Lin, 1991; Guest *et al.*, 1996; Uden, 1998).

Um diese Hierarchie zu gewährleisten, wird die Expression der terminalen Reduktasen durch Transkriptionsregulatoren kontrolliert, deren Aktivität durch Umweltsignale beeinflusst wird. Die Abwesenheit von Sauerstoff wird durch das Zweikomponentensystem ArcB/A (aerobic respiration control) (Iuchi and Lin, 1988; Iuchi *et al.*, 1989) und den Regulator FNR (fumarate/nirate regulator) (Shaw *et al.*, 1982) erkannt. Ist Nitrat oder Nitrit vorhanden, erfolgt die Regulation über das Zweikomponentensystem NarX/L und NarQ/P (nitrate respiration) (Stewart, 1993; Stewart and Rabin, 1995). Diese Transkriptionsregulatoren wirken allein oder in Kombination, so dass die Expression der terminalen Reduktasen in Abhängigkeit des bevorzugten Elektronenakzeptors mit der höchsten H^+/e^- -Rate und der höchsten ATP-Ausbeute erfolgt (Uden and Bongaerts, 1997).

Aufbau und Regulation der NADH-Dehydrogenasen

NADH ist der wichtigste Elektronendonator in der Atmungskette von *E. coli* beim Wachstum mit vielen Substraten (Tran *et al.*, 1997). *E. coli* besitzt zwei NADH-Dehydrogenasen (Young *et al.*, 1981; Matsushita *et al.*, 1987; Calhoun and Gennis, 1993b) (Abb. 1). Die NADH-Dehydrogenase I (NADH: Ubichinon Oxidoreduktase, *nuo*) (Weidner *et al.*, 1993, Friedrichs *et al.*, 1995) wird durch 13 Strukturgene (*nuoA-N*) codiert, da *nuoC* und *nuoD* eine gemeinsames Gen bilden. Dieser Multienzymkomplex ist auf Minute 51 des *E. coli* Chromosoms lokalisiert und besteht aus 13 Untereinheiten (Spehr *et al.*, 1999). Das Enzym koppelt die NADH-Oxidation mit der Translokation von 3-4 H^+ über die Cytoplasmembran und trägt so zur Generation eines Protonenpotentials bei. Die NADH-Dehydrogenase I entspricht in Aufbau und Funktion dem mitochondrialen Atmungskomplex I (Weidner *et al.*, 1993; Leif *et al.*, 1995)

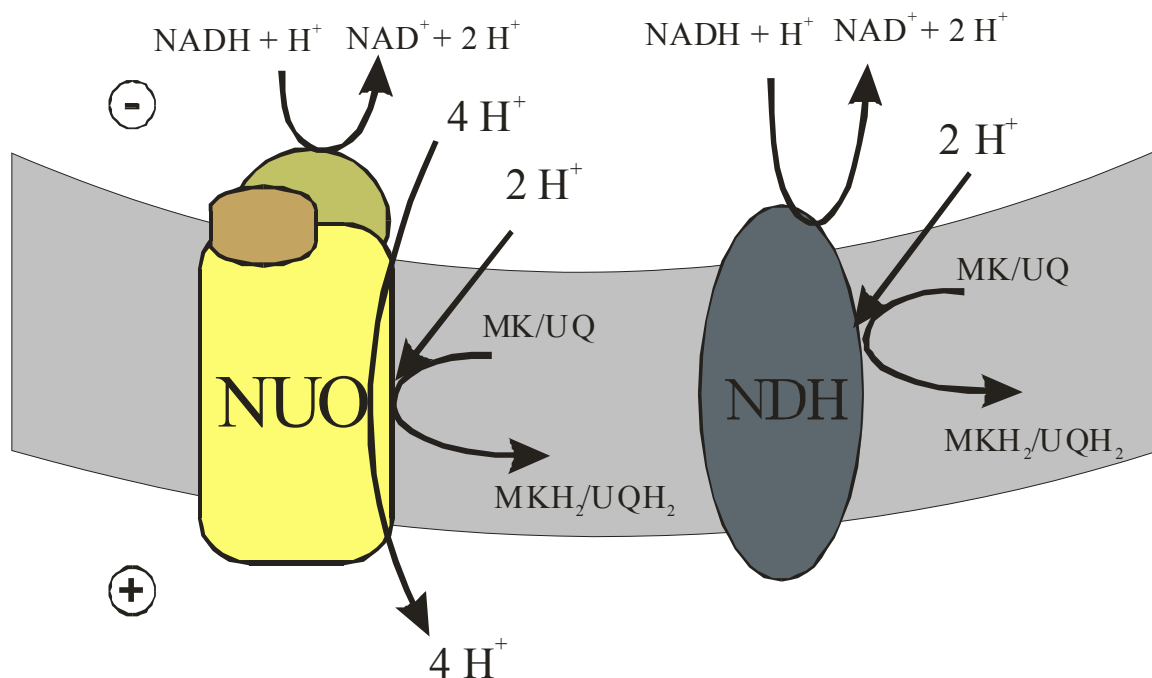


Abb. 1: Membrantopologie und H^+ -Translokation der NADH-Dehydrogenase I (*nuo*) und II (*ndh*). Der *E. coli* Komplex I (*nuo*) besteht aus drei verschiedenen Subkomplexen, die wiederum aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind: der periphere (NuoEFG) (grün), der verbindende (NuoBCDI) (braun) und der Membran- (NuoAHJN) Subkomplex (gelb). Das periphere Fragment besitzt die NADH-Dehydrogenaseaktivität und oxidiert NADH zu NAD^+ . Das Membranfragment katalysiert die Reduktion von Ubichinon (UQ) oder Menachinon (MK) zu Ubichinol (UQH_2) oder Menachinol (MKH_2). Die NADH-Dehydrogenase II (Ndh) besteht nur aus einem monomeren Flavoprotein (FAD).

Das alternative Enzym, die NADH-Dehydrogenase II wird durch das *ndh* Gen codiert. Hierbei handelt es sich um ein membrangebundenes monomeres Flavoprotein (FAD) (Green *et al.*, 1997), das die gleiche Reaktion wie *nuo* katalysiert. Dieses Enzym ist allerdings nicht

an der Energiekonservierung beteiligt. Beide Enzyme werden unter verschiedenen Bedingungen synthetisiert (Calhoun *et al.*, 1993a; Calhoun und Gennis, 1993b). Das *nuo*-Operon wird sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen exprimiert. Die NADH-Dehydrogenase II wird hauptsächlich während des aeroben Wachstums synthetisiert und unter anaeroben Bedingungen durch den Sauerstoffregulator FNR reprimiert (Spiro *et al.*, 1989; Green and Guest, 1994). Der Gebrauch der NADH-Dehydrogenase II unter aeroben Bedingungen hat zur Folge, dass wegen der fehlenden H^+ -Translokation die H^+/e^- und ATP/e^- Quotienten nicht den maximal möglichen entsprechen.

E. coli ist in der Lage, durch den Gebrauch von verschiedenen regulatorischen Elementen für die Dehydrogenasen und terminalen Reduktasen ein Gleichgewicht zwischen Umsatzrate und hohem ATP Gewinn zu finden, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten (Unden und Bongaerts, 1997; Unden und Schirawski, 1997).

Die physiologische Bedeutung der NADH-Dehydrogenase I spiegelt sich in der transkriptionellen Regulation (Abb. 2) durch die entsprechenden Umweltsignale wider (Bongaerts *et al.*, 1995), besonders in Abhängigkeit von den terminalen Elektronenakzeptoren Sauerstoff, Nitrat, Fumarat und DMSO. (Bongaerts *et al.*, 1995; Wackwitz *et al.*, 1999; Green und Guest., 1994; Green *et al.*; 1996; Tran *et al.*, 1997). Unter fermentativen Bedingungen, d.h. in Abwesenheit eines e^- -Akzeptors ist die Aktivität am geringsten. Die Transkription von *nuo* wird außerdem durch die C-Quelle beeinflusst. Dementsprechend wird die Expression von *nuoA'* unter aeroben Bedingungen von Glucose reprimiert und ist beim Wachstum mit nicht fermentierbaren Substraten wie den C_4 -Dicarboxylaten Fumarat oder Succinat, oder Glycerin am höchsten (Bongaerts *et al.*, 1995; Tran *et al.*, 1997). Die Regulatoren und ihre Bindestellen am Promotor von *nuo* sind bereits identifiziert worden (Bongaerts *et al.*, 1995; Wackwitz *et al.*, 1999; Wackwitz, 1999).

Die Sauerstoff-abhängige Regulation der NADH-Dehydrogenase I wird durch das Zweikomponentensystem ArcB/A vermittelt (Bongaerts *et al.*, 1995). ArcB ist eine membranständige Sensorkinase und ArcA der cytoplasmatische Responseregulator. Dieser bindet mit seiner DNA-bindenden (Helix-Turn-Helix) Domäne an die Promotorregion seiner Zielgene. Unter anaeroben Bedingungen wird ArcB autophosphoryliert. ArcB bildet mit fünf weiteren Proteinen (BarA, EvgS, TorS und YoiN) eine neuen Klasse von Hybridsensorkinasen (Matsushika und Mizuno, 1998). Diese besitzen neben der üblichen Transmitterdomäne (His_{292}) eine Receiverdomäne (Asp_{576}) und eine weitere

Transmitterdomäne (His₇₁₇) (Tsuzuki und Mizuno, 1995). Der Phosphoryltransfer von ArcB zu ArcA erfolgt vermutlich über das Histidin an Position 292. Das Signal für die Autophosphorylierung von ArcB ist bisher noch nicht eindeutig identifiziert. Sauerstoff kann als direktes Signal ausgeschlossen werden. Stattdessen könnten Chinone in oxidierte Form als Signal für ArcB dienen, die dem Arc-System den Redoxzustand der Elektronentransportkette vermitteln (Georgellis und Lin, 2001).

Das phosphorylierte ArcB überträgt die Phosphatgruppe auf den Responseregulator ArcA (Iuchi und Lin, 1995), der dadurch in die aktivierte Form überführt wird. ArcA-P bindet an die DNA in der Promotorregion von *nuo* und reprimiert dessen Expression. Für ArcA-P konnten zwei Bindestellen am *nuo*-Promotor identifiziert werden (*arc1* und *arc2*) (Abb. 2). Die Bindestelle *arc1* umfasst den Bereich von -283 bis -345 und hat ihr Zentrum bei -315. Die zweite ArcA-Bindestelle reicht von Position -44 bis -122 und hat ihr Zentrum bei -83 (Wackwitz, 1999). Die Größe der geschützten Bereiche mit mehr als 60 bp ist deutlich größer als der Bereich, der von den meisten dimeren (Helix-Turn-Helix) DNA-Bindeproteinen geschützt wird. Er ist aber typisch für ArcA regulierte Promotoren (Lynch und Lin., 1996). ArcA bindet in der Regel an sehr große Bereiche seiner Ziel-DNA. In Genen wie *pfl*, *cyd* und *sodA* bindet ArcA-P an einen regulatorischen Bereich von ca. 60 bp und in *oriC* sogar 150 bp (Jeon *et al.*, 2001).

Liegt Nitrat unter anaeroben Bedingungen als alternativer Elektronenakzeptor vor, so erfolgt eine zusätzliche Regulation von *nuo* über das NarX/L Zweikomponentensystem (Stewart und Rabin, 1995). In Anwesenheit von Nitrat wird die membranständige Sensorkinase NarX phosphoryliert und überträgt die Phosphatgruppe auf den Responseregulator NarL. NarL-P ist ein positiver Regulator von *nuo* und aktiviert dessen Expression. Eine mögliche NarL-P Konsensussequenz (TACYNMT, mit Y=C oder T; M=A oder C) (Li und Stewart, 1992) befindet sich in Position -277 vor dem *nuo*-Promotor (Bongaerts *et al.*, 1995).

Der generelle Regulator IHF (integration host factor, Friedman, 1988), dessen Funktion bisher noch nicht geklärt ist, reprimiert die Expression von *nuo* unter allen getesteten Bedingungen. Das IHF-Protein bindet im Bereich der *arc2* Bindestelle (Wackwitz, 1999). Zusätzlich wird in der frühen exponentiellen Wachstumsphase die Expression der NADH-Dehydrogenase I durch das Fis Protein (factor of inversion stimulation) aktiviert. Für Fis konnten drei Bindestellen am *nuo*-Promotor identifiziert werden (Wackwitz, 1999).

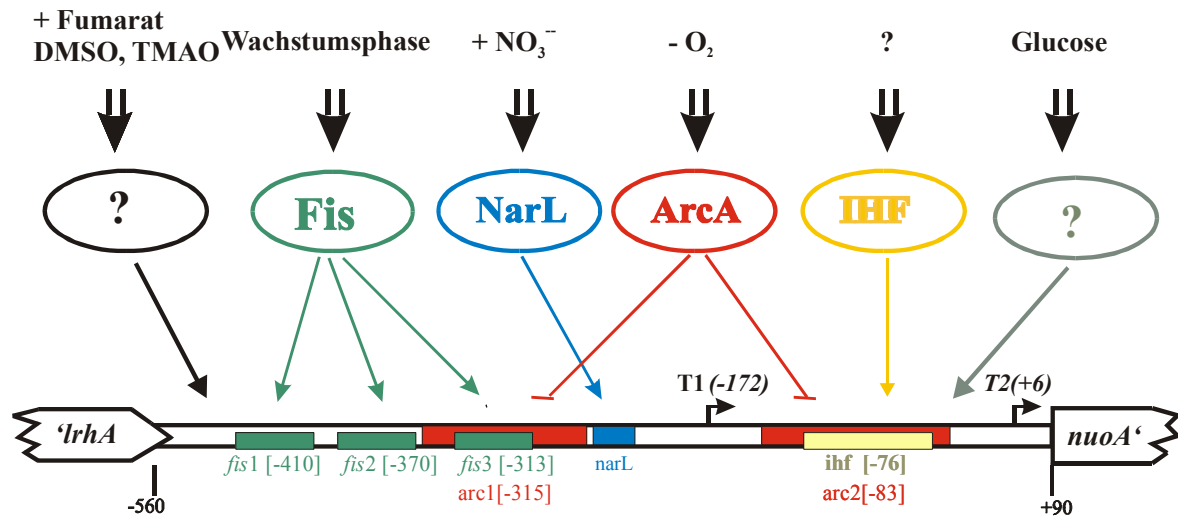


Abb. 2: Signale und Regulatoren der Transkription von *nuo*. Dargestellt ist der komplette intergenische Bereich vor *nuoA*' mit dem Translationsstart (+91) und den beiden Transkriptionsstartpunkten T1 und T2, sowie die bekannten Regulatoren mit ihren Bindestellen (ArcA, Fis, IHF und NarL) und die bekannten Signale (Glucose, Fumarat, DMSO, TMAO).

Strukturelemente prokaryotischer RNA-Polymerasen

Prokaryotische RNA-Polymerasen bestehen aus fünf Untereinheiten (Yager und Hippel, 1987). Das Kern-Enzym setzt sich aus 4 Untereinheiten (α_2 -, β - und β' -Untereinheit) zusammen (Abb. 3). Das aktive Zentrum zur Synthese von RNA aus Nucleosidtriphosphaten (NTP's) befindet sich in der β -Untereinheit, während die β' -Untereinheit unspezifisch an die DNA bindet (Ishihama, 1993). Die beiden α Untereinheiten sind für die Stabilisierung des Kern-Enzyms verantwortlich. Der C-terminale Bereich der α -Untereinheiten reguliert die Initiation der Transkription, indem er entweder mit der DNA in Kontakt tritt oder Wechselwirkung mit Transkriptionsaktivatoren einget. Der Zusammenhang zwischen Promotorstruktur und Transkriptionsaktivierung wurde vor allem in *E. coli* intensiv untersucht und modellhaft beschrieben (Busby und Ebricht, 1993).

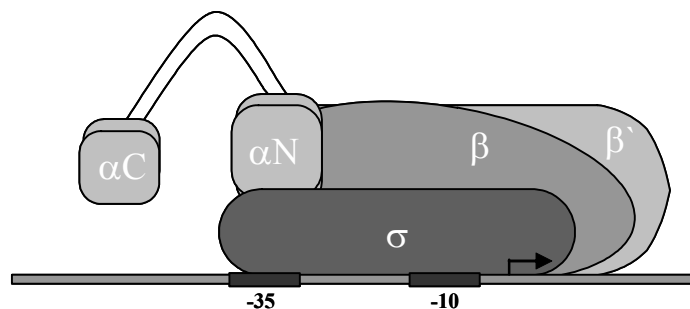


Abb. 3: Modell der RNA-Polymerase aus *E. coli* (verändert nach Busby und Ebricht, 1993) Gezeigt sind die 4 verschiedenen Untereinheiten (α_2 (α C und α N), β und β') der RNAP und der Sigma(σ)-Faktor mit den spezifischen Erkennungssequenzen für σ^{70} -regulierte Promotoren: -10, -35-Region.

Die spezifische Erkennung von Promotoren und die Initiation der Transkription werden durch den Sigma(σ)-Faktor vermittelt (Helmann und Chamberlain, 1988). Das Holoprotein $E\sigma^{70}$, das für die Transkription der meisten Gene in *E. coli* verantwortlich ist, erkennt drei DNA Sequenzelemente. Die -10 Region mit der Konsensussequenz TATAAT befindet sich 10 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt. Die -35 Region mit der Konsensussequenz TTGACA befindet sich 16 bis 19 bp stromabwärts von der -10 Region (Gross *et al.*, 1992). Stromauf des -35 Hexamers, welches von der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit erkannt wird, befindet sich ein weiteres Element, eine AT-reiche Region (Newlands *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1994). Je größer die Ähnlichkeiten der Sequenzen zu den Konsensussequenzen sind, desto besser bindet die RNA-Polymerase an diese Bereiche.

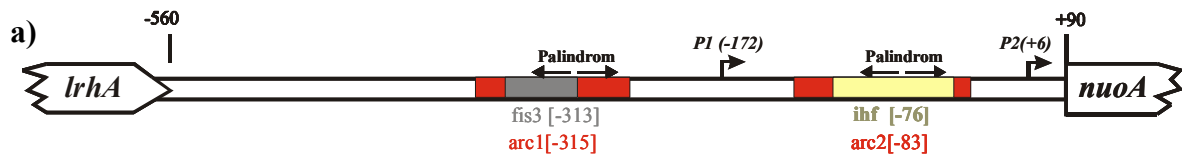
Der regulatorische Bereich vor dem *nuo*-Operon

Das *nuoA-N* Operon zeichnet sich durch einen großen, 650 bp langen intergenischen Bereich vor dem Operon aus. In diesem Bereich vor *nuoA* konnten zwei Transkriptionsstartpunkte T1 (-172/173) und T2 (+6) identifiziert werden (Bongaerts *et al.*, 1995). Diesen Transkriptionsstartpunkten konnten durch Vergleich mit den in Abb. 4 dargestellten Konsensussequenzen potentielle Promotorregionen zugeordnet werden (Bongaerts, 1996).

	„ - 35 Region“		16- 19 bp		„- 10 Region“
	<u>T T G A C A</u>				<u>T A T A A T</u>
P1	-209	TT T C CA	ttgcttcacaacgga		C A C G AT
P2	-33	TT A G C T	gtataaaagaatttctac		A G T G AT

Abb. 4: Potentielle Promotoren des *nuo*-Operons. Übereinstimmungen der Konsensussequenzen mit der „-10-Region“ und „-35-Region“ sind umrandet und in rot dargestellt.

Promotor P1 befindet sich stromauf des Haupttranskriptes T1 und besitzt eine schwach konservierte -10 und eine gut konservierte -35 Region. Der zweite Promotor P2 befindet sich stromauf des Transkriptionsstartpunktes T2. Seine -10, -35 Regionen sind weniger gut konserviert. Auffällig ist die Lage der beiden ArcA-Bindestellen (*arc1*, *arc2*) stromauf der beiden Transkriptionsstartpunkte. *Arc1* befindet sich 110 bp vor T1 und *arc2* 50 bp vor T2. Die beiden ArcA-Bindestellen *arc1* und *arc2* enthalten palindromische Sequenzen (Abb. 5).



b) Promoter P1 mit erstem Palindrom in arc1:

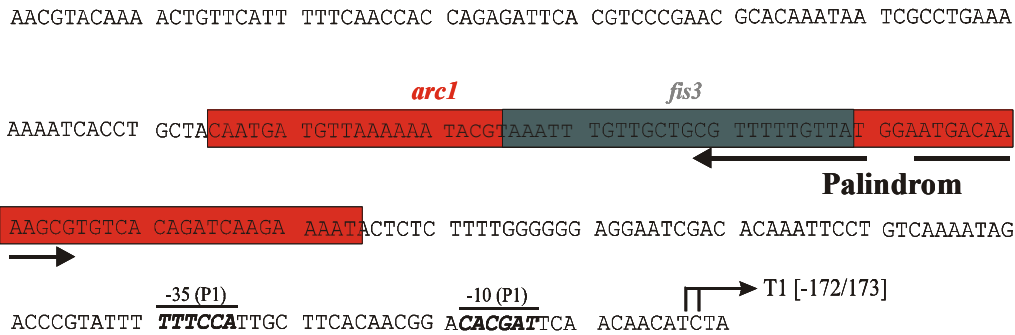


Abb. 5: Molekulare Architektur des nuo-Promotors (P1+P2) (a) und der Region des Palindroms in arc1 stromauf von Promotor P1 (b). Die ArcA (rot), Fis (grau) und IHF (gelb) Bindestellen und die beiden Promotoren P1 und P2 sind dargestellt. Das Palindrom am Beispiel der Bindestelle arc1 ist durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Der Einfluss dieser Strukturelemente auf die Regulation der NADH-Dehydrogenase I ist noch nicht bekannt. Durch Vergleiche von Konsensussequenzen Glucose abhängiger Aktivatoren oder Repressoren konnten zwei Proteine, Mlc (making lager colonies) und NagC (Repressor des N-Acetylglucosaminoperons), identifiziert werden, deren Konsensusregionen eine große Ähnlichkeit zu den Palindromen des nuo-Promotors aufweisen (Abb. 6) (Plumbridge, 2001b; Tanak *et al.*, 1999; Plumbridge, 1998).

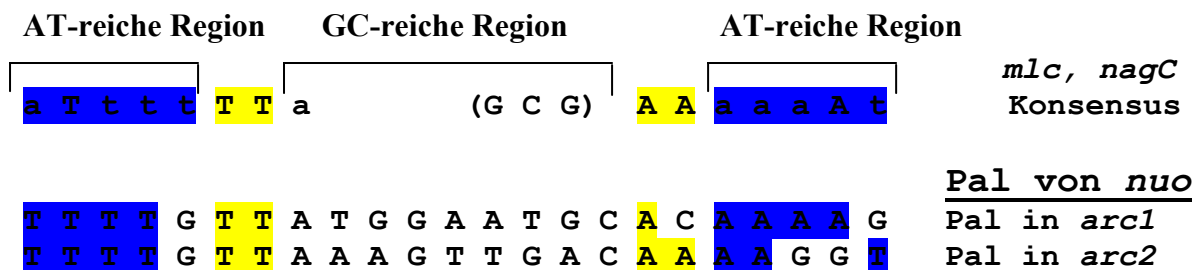


Abb. 6: Vergleich der beiden Palindrome (Pal) des nuo-Promotors mit der Mlc und NagC Konsensussequenz. Übereinstimmende Regionen sind farblich markiert.

Aufgaben und Fragestellungen

Ziel der Arbeit war, die Architektur und Funktion der großen regulatorischen Region vor *nuoA* mit den beiden Promotoren und Bindestellen für Regulatoren aufzuklären. Dazu musste zunächst der Beitrag der einzelnen Promotoren (P1 und P2) zu der Gesamtexpression der NADH-Dehydrogenase I bestimmt werden. Danach galt es deren Abhängigkeit von den Regulatoren ArcA und IHF zu analysieren. Die beiden Promotoren wurden *in vivo* und *in vitro* getrennt untersucht, um eine Interaktion mit dem Nachbarpromotor zu vermeiden. Da bisher nur die Bindung und Regulation des anaeroben Regulators ArcA für den kompletten Promotor bekannt war, wurde die Bindung von ArcA an die beiden einzelnen Bindestellen untersucht.

Die Expression der beiden getrennten Promotoren und der Einfluss von ArcA und IHF wurden unter aeroben und anaeroben Bedingungen *in vivo* anhand von Reporterfusionen getestet. So konnte der Einfluss der beiden isolierten Promotoren auf die Expression von *nuo* untersucht werden. Weiterhin wurde durch Mutagenese der ArcA-Konsensussequenzen der Bindestellen *arc1* und *arc2* der molekulare Mechanismus der ArcA Regulation charakterisiert.

Die Bindung von ArcA an den intergenischen Bereich vor *nuoA* wurde durch Gelretardationsanalysen und DNaseI Footprints mit gereinigtem Protein untersucht.

Mit der *in vitro* Transkription kann man die Beteiligung von Genregulatoren und anderen Faktoren ohne störende Einflüsse anderer Faktoren aus der Zelle untersuchen. Um die Transkription der NADH-Dehydrogenase I und deren Repression durch den anaeroben Regulator ArcA besser untersuchen zu können, wurden *in vitro* Transkriptionsexperimente mit den beiden Promotoren durchgeführt.

Als weiteres Ziel der Arbeit sollte die Beteiligung der Regulatorproteine des Glucose und C-Stoffwechsels Mlc, NagC oder CRP (cAMP-Rezeptor-Protein) untersucht werden. Hier galt es, zu prüfen, ob eine genetische Inaktivierung dieser Gene unter aeroben Bedingungen Auswirkungen auf die durch Glucose vermittelte Repression von *nuo* haben.

Letztlich sollte der Einfluss von NarL an der Regulation der NADH-Dehydrogenase I unter anaeroben Bedingungen untersucht werden. Dazu wurde die Bindung von NarL mit Hilfe von Gelretardationsanalysen und DNaseI Footprints mit dem gereinigten aktivierten Transkriptionsfaktor überprüft. Eine mögliche Wechselwirkung mit ArcA wurde durch Expressionsstudien mit Reporterfusionen bestimmt.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Stämme von *E. coli*

Tab. 1: Verwendete *E. coli* Stämme, Plasmide und Phagen

Stamm	Genotyp	Herkunft
MC4100	F ⁻ <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150 relA1 flbB530 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Silhavy <i>et al.</i> , 1984
BL21	<i>E. coli</i> B, F' <i>hsdS gal1 DE3</i>	Studier und Moffat, 1986
RM312	MC4100, aber $\Delta 3$ (<i>ihfB</i>), Cam ^R	Sawers und Suppmann, 1992
RM313	MC4100, aber <i>arcA1 zjj::Tn10</i> (Tet) ^R	Sawers und Suppmann, 1992
RM600	MC4100, aber <i>narL zjj::Tn10</i> (Tet) ^R	Sawers, 1993
IMW17	MC4100, aber <i>arc1 zjj::Tn10</i> (Tet) ^R , <i>narL219::Tn5</i> (Kan) ^R	Bongaerts <i>et al.</i> , 1995
IBPC536	<i>thi-1, argG6, argE3, his-4, xyl-5, mtl-1, tsx-29, rpsL, $\Delta lacX74, mlc-1 nagC::tc$</i>	Plumbridge (1991)
KD413	<i>araD139 deoC1 flbB5301 ptsF25 rbsR relA1 rpsL150</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>mlc::Tn10</i> (Tet) ^R	Boos, 2001
IMW33	MC4100, aber λ (Φ (P1 _{<i>arc1wt</i>} P2 _{<i>arc2wt</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>)hyb, <i>bla+</i>)	Bongaerts <i>et al.</i> , 1995
IMW35	MC4100, aber <i>arcA1 zjj::Tn10</i> λ (Φ (P1 _{<i>arc1wt</i>} P2 _{<i>arc2wt</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>)hyb, <i>bla+</i>)	Bongaerts <i>et al.</i> , 1995
IMW36	MC4100, aber <i>narL215::Tn10</i> (Tet) ^R λ (Φ (P1 _{<i>arc1wt</i>} P2 _{<i>arc2wt</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>)hyb, <i>bla+</i>)	Bongaerts <i>et al.</i> , 1995
IMW37	MC4100, aber <i>del3 himD</i> , (Cm) ^R , λ (Φ (P1 _{<i>arc1wt</i>} P2 _{<i>arc2wt</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>)hyb, <i>bla+</i>)	Bongaerts <i>et al.</i> , 1995
IMW286	wie IMW33, aber P1 _{<i>arc1ab</i>} P2 _{<i>arc2wt</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	Wackwitz, 1999
IMW287	wie IMW35, aber P1 _{<i>arc1ab</i>} P2 _{<i>arc2wt</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	Wackwitz, 1999
IMW288	wie IMW37, aber P1 _{<i>arc1ab</i>} P2 _{<i>arc2wt</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	P1(IMW37) x IMW286
IMW296	wie IMW36, aber P1 _{<i>arc1ab</i>} P2 _{<i>arc2wt</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	λ MW136 x RM600
IMW297	wie IMW30, aber P1 _{<i>arc1ab</i>} P2 _{<i>arc2wt</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	λ MW136 x IMW30
IMW300	wie IMW311, aber P1 _{<i>arc1ab</i>} P2 _{<i>arc2wt</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	λ MW136 x IMW17
IMW301	wie IMW311, aber P1 _{<i>arc1wt</i>} P2 _{<i>arc2ab</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	λ MW158 x IMW17
IMW302	wie IMW311, aber P1 _{<i>arc1ab</i>} P2 _{<i>arc2ab</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	λ MW160 x IMW17
IMW303	wie IMW33, aber P1 _{<i>arc1wt</i>} P2 _{<i>arc2ab</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	λ MW158 x MC4100
IMW304	wie IMW35, aber P1 _{<i>arc1wt</i>} P2 _{<i>arc2ab</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	λ MW158 x RM313
IMW305	wie IMW37, aber P1 _{<i>arc1wt</i>} P2 _{<i>arc2ab</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	P1(IMW37) x IMW303
IMW307	wie IMW33, aber P1 _{<i>arc1ab</i>} P2 _{<i>arc2ab</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	λ MW160 x MC4100
IMW308	wie IMW35, aber P1 _{<i>arc1ab</i>} P2 _{<i>arc2ab</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	λ MW160 x RM313
IMW309	wie IMW37, aber P1 _{<i>arc1ab</i>} P2 _{<i>arc2ab</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	P1(IMW37) x IMW307
IMW312	wie IMW36, aber P1 _{<i>arc1wt</i>} P2 _{<i>arc2ab</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	λ MW158 x RM600
IMW313	wie IMW36, aber P1 _{<i>arc1ab</i>} P2 _{<i>arc2ab</i>} - <i>nuoAB'</i> - <i>'lacZ</i>	λ MW160 x RM600

IMW311	MC4100, aber <i>arcA1</i> zjj::Tn10 (Tet) ^R , <i>narL</i> ::Tn5 (Kan) ^R , λ(Φ(P1 _{arc1wt} P2 _{arc2wt} - <i>nuoAB'</i> - <i>lacZ</i>))hyb, <i>bla</i> +	λMW6 x IMW17
IMW341	wie IMW33, aber P1 _{arc1wt} P2 _{arc2abcd} - <i>nuoAB'</i> - <i>lacZ</i>	λMW265 x MC4100
IMW342	wie IMW35, aber P1 _{arc1wt} P2 _{arc2abcd} - <i>nuoAB'</i> - <i>lacZ</i>	λMW265 x RM313
IMW343	wie IMW37, aber P1 _{arc1wt} P2 _{arc2abcd} - <i>nuoAB'</i> - <i>lacZ</i>	λMW265 x IMW17
IMW344	wie IMW33, aber P1 _{arc1ab} P2 _{arc2abcd} - <i>nuoAB'</i> - <i>lacZ</i>	λMW264 x MC4100
IMW345	wie IMW35, aber P1 _{arc1ab} P2 _{arc2abcd} - <i>nuoAB'</i> - <i>lacZ</i>	λMW264 x RM313
IMW346	wie IMW37, aber P1 _{arc1ab} P2 _{arc2abcd} - <i>nuoAB'</i> - <i>lacZ</i>	λMW264 x IMW17
IMW62	wie IMW33, (P1 _{arc1wt} P2 _{arc2wt} - <i>nuoAB'</i> - <i>lacZ</i>), aber <i>Δcyo851</i>	Bongaerts <i>et al.</i> , 1995
IMW357	MC4100 λ(Φ(<i>nuo</i> P2 _{arc2wt} - <i>lacZ</i>))hyb, <i>bla</i> +) (<i>EcoRI</i> - <i>Bam</i> HI (203bp) <i>nuo</i> -Promotor Fragment nur mit Promotor2 in pMW174 kloniert (für transkriptionelle Fusionen))	λMW201 x MC4100
IMW358	MC4100 λ(Φ(<i>nuo</i> P2 _{arc2wt} - <i>lacZ</i>))hyb, <i>bla</i> +) <i>arcA1</i> zjj::Tn10, (Tet) ^R (<i>EcoRI</i> - <i>Bam</i> HI (203bp) <i>nuo</i> -Promotor Fragment nur mit Promotor1 in pMW174 kloniert (für transkriptionelle Fusionen))	λMW201 x RM313
IMW359	wie IMW 357, aber (<i>nuo</i> P2 _{arc2ab} - <i>lacZ</i>)	λMW202 x MC4100
IMW360	wie IMW 358, aber (<i>nuo</i> P2 _{arc2ab} - <i>lacZ</i>)	λMW202 x RM313
IMW361	wie IMW 357, aber (<i>nuo</i> P2 _{arc2abcd} - <i>lacZ</i>)	λMW203 x MC4100
IMW362	wie IMW 358, aber (<i>nuo</i> P2 _{arc2abcd} - <i>lacZ</i>)	λMW203 x RM313
IMW367	MC4100 λ(Φ (<i>nuo</i> P1 _{arc1wt} P2 _{arc2wt} - <i>lacZ</i>))hyb, <i>bla</i> +) (<i>EcoRI</i> - <i>Bam</i> HI (598bp) <i>nuo</i> -Promotor wt Fragment in pMW174 kloniert (für transkriptionelle Fusionen))	λMW206 x MC4100
IMW368	MC4100 λ(Φ(<i>nuo</i> P1 _{arc1wt} P2 _{arc2wt} - <i>lacZ</i>))hyb, <i>bla</i> +) <i>arcA1</i> zjj::Tn10, (Tet) ^R (<i>EcoRI</i> - <i>Bam</i> HI (598bp) <i>nuo</i> -Promotor Fragment in pMW174 kloniert (für transkriptionelle Fusionen))	λMW206 x RM313
IMW347	MC4100 λ(Φ (<i>nuo</i> P1 _{arc1ab} P2 _{arc2wt} - <i>lacZ</i>))hyb, <i>bla</i> +) (<i>EcoRI</i> - <i>Bam</i> HI (598bp) <i>nuo</i> -Promotor Fragment in pMW174 kloniert (für transkriptionelle Fusionen)) mit erster ArcA Bindestelle (1ab) mutiert	λMW210 x MC4100
IMW348	MC4100 λ(Φ(<i>nuo</i> P1 _{arc1ab} P2 _{arc2wt} - <i>lacZ</i>))hyb, <i>bla</i> +) <i>arcA1</i> zjj::Tn10, (Tet) ^R (<i>EcoRI</i> - <i>Bam</i> HI (598bp) <i>nuo</i> -Promotor Fragment in pMW174 kloniert (für transkriptionelle Fusionen)) mit erster ArcA Bindestelle (1ab) mutiert	λMW210 x RM313
IMW349	wie IMW367, aber (<i>nuo</i> P1 _{arc1wt} P2 _{arc2abcd} - <i>lacZ</i>)	λMW209 x MC4100
IMW350	wie IMW368, aber (<i>nuo</i> P1 _{arc1wt} P2 _{arc2abcd} - <i>lacZ</i>)	λMW209 x RM313
IMW351	wie IMW367, aber (<i>nuo</i> P1 _{arc1ab} P2 _{arc2abcd} - <i>lacZ</i>)	λMW208 x MC4100
IMW352	wie IMW368, aber (<i>nuo</i> P1 _{arc1ab} P2 _{arc2abcd} - <i>lacZ</i>)	λMW208 x RM313

IMW383	wie IMW367, aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2ab}-lacZ</i>)	λMW215 x MC4100
IMW419	wie IMW368, aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2ab}-lacZ</i>)	λMW215 x RM313
IMW384	wie IMW367 aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2wt}-lacZ</i>)	λMW216 x MC4100
IMW420	wie IMW368, aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2wt}-lacZ</i>)	λMW216 x RM313
IMW412	wie IMW368, aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2abcd}-lacZ</i>)	λMW252 x RM313
IMW410	wie IMW367 (<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2wt}-lacZ</i>), aber <i>del3 himD</i> , (Cm) ^R	P1(IMW37) x IMW367
IMW411	wie IMW368 (<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2wt}-lacZ</i>), aber <i>del3 himD</i> , (Cm) ^R	P1(IMW37) x IMW368
IMW363	MC4100 λ(Φ((<i>nuoP1_{arc1wt}-lacZ</i>))hyb, <i>bla+</i>) (<i>EcoRI-BamHI</i> (406bp) <i>nuo</i> -Promotor Fragment nur mit Promotor1 in pMW174 kloniert (für transkriptionelle Fusionen))	λMW204 x MC4100
IMW364	MC4100 λ(Φ((<i>nuoP1_{arc1wt}-lacZ</i>))hyb, <i>bla+</i>) <i>arcAI</i> <i>zjj::Tn10</i> , (Tet) ^R (<i>EcoRI-BamHI</i> (406bp) <i>nuo</i> -Promotor Fragment nur mit Promotor1 in pMW174 kloniert (für transkriptionelle Fusionen))	λMW204 x RM313
IMW365	wie IMW 363, aber (<i>nuoP1_{arc1ab}-lacZ</i>)	λMW205 x MC4100
IMW366	wie IMW 364, aber (<i>nuoP1_{arc1ab}-lacZ</i>)	λMW205 x RM313
IMW382	wie IMW 363, aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}-lacZ</i>)	λMW214 x MC4100
IMW421	wie IMW 364, aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}-lacZ</i>)	λMW214 x RM313
IMW408	wie IMW363(<i>nuoP1_{arc1wt}-lacZ</i>), aber <i>del3 himD</i> , (Cm) ^R	P1(IMW37) x IMW363
IMW409	wie IMW364(<i>nuoP1_{arc1wt}-lacZ</i>), aber <i>del3 himD</i> , (Cm) ^R	P1(IMW37) x IMW364
IMW378	wie IMW33 P1 _{arc1wt} P2 _{arc2wt} - <i>nuoAB'</i> - <i>lacZ</i> , aber <i>mlc::Tn10</i> (Kan) ^R	P1(KD413) IMW33
IMW401	wie IMW357 (<i>nuoP2_{arc2wt}-lacZ</i>), aber <i>del3 himD</i> , (Cm) ^R	P1(IMW37) x IMW357
IMW402	wie IMW359 (<i>nuoP2_{arc2ab}-lacZ</i>), aber <i>del3 himD</i> , (Cm) ^R	P1(IMW37) x IMW359
IMW403	wie IMW361 (<i>nuoP2_{arc2abcd}-lacZ</i>), aber <i>del3 himD</i> , (Cm) ^R	P1(IMW37) x IMW361
IMW404	wie IMW358 (<i>nuoP2_{arc2wt}-lacZ</i>), aber <i>del3 himD</i> , (Cm) ^R	P1(IMW37) x IMW358
IMW405	wie IMW360 (<i>nuoP2_{arc2ab}-lacZ</i>), aber <i>del3 himD</i> , (Cm) ^R	P1(IMW37) x IMW360
IMW406	wie IMW362(<i>nuoP2_{arc2abcd}-lacZ</i>), aber <i>del3 himD</i> , (Cm) ^R	P1(IMW37) x IMW362
IMW407	wie IMW33 (P1 _{arc1wt} P2 _{arc2wt} - <i>nuoAB'</i> - <i>lacZ</i>), aber NagC:tet	P1(IBPC536) x IMW33
IMW413	wie IMW367, aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2abcd}-lacZ</i>)	λMW252 x MC4100
IMW423	wie IMW368, aber (<i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2ab}-lacZ</i>)	λMW207 x MC4100
IMW422	wie IMW367, aber (<i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2ab}-lacZ</i>)	λMW206 x MC4100

Plasmide

pMW5	pBlue KS ⁻ , (Ap) ^R , enthält 577-bp <i>Clal/EcoRV-nuo</i> -Promotor (<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2wt}</i>)	Bongaerts, 1996
pMW164	wie pMW5, aber <i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2wt}</i>	Site-Directed Mutagenese von pMW5
pMW166	wie pMW5, aber <i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2ab}</i>	Site-Directed Mutagenese von pMW166
pMW217	wie pMW5, aber <i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2ab}</i>	Site-Directed Mutagenese von pMW166
pMW218	wie pMW5, aber <i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2wt}</i>	Site-Directed Mutagenese von pMW164
pMW174	wie pJL30, aber <i>PstI/HindIII</i> Linker von pME3535 für transkriptionelle Fusionen	Blumer, persönlich
pMW6	MC4100, p(Φ (<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2wt}-nuoAB'-lacZ</i>)hyb, <i>bla+</i>)	Bongaerts <i>et al.</i> , 1995
pMW136	wie pMW6, aber <i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2wt}-nuoAB'-lacZ</i>	Wackwitz, 1999
pMW158	wie pMW6, aber <i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2ab}-nuoAB'-lacZ</i>	Site-Directed Mutagenese von pMW6
pMW160	wie pMW6, aber <i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2ab}-nuoAB'-lacZ</i>	Site-Directed Mutagenese von pMW136
pMW264	wie pMW6, aber <i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2abcd}-nuoAB'-lacZ</i>	Site-Directed Mutagenese von pMW160
pMW265	wie pMW6, aber <i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2abcd}-nuoAB'-lacZ</i>	Site-Directed Mutagenese von pMW158
pETArcA-1	ArcA-Gen im pET28a(+)(Novagen), zur Überproduktion von ArcA mit His-Taq	Sawers, 1997
pMW150	NarL-Gen Gen im pET28a(+)(Novagen) (<i>NdeI/</i> <i>EcoRI</i>), zur Überproduktion von NarL mit His-Taq	PCR-Produkt + pET28a
pMW206	598bp <i>EcoRI-BamHI</i> Fragment des <i>nuo</i> -Promotors mit erstem und zweitem Promotor in pMW174 <i>EcoRI-BamHI</i> inkloniert (<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2wt}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW207	wie pMW206, aber (<i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2ab}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW208	wie pMW206, aber (<i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2abcd}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW209	wie pMW206, aber (<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2abcd}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW210	wie pMW206, aber (<i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2wt}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW215	wie pMW206, aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2ab}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW216	wie pMW206, aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2wt}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW252	wie pMW206, aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2abcd}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW204	406bp <i>EcoRI-BamHI</i> Fragment des <i>nuo</i> -Promotors nur mit erstem Promotor in pMW174 <i>EcoRI- BamHI</i> inkloniert (<i>nuoP1_{arc1wt}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW205	wie pMW204, aber (<i>nuoP1_{arc1ab}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW214	wie pMW204, aber (<i>nuoP1_{arc1abcd}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174

pMW201	203bp <i>EcoRI-BamHI</i> Fragment des <i>nuo</i> -Promotors nur mit zweitem Promotor in pMW174 <i>EcoRI-BamHI</i> einkloniert (<i>nuoP2_{arc2wt}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW202	wie pMW201, aber (<i>nuoP2_{arc2ab}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMW203	wie pMW201, aber (<i>nuoP2_{arc2abcd}-lacZ</i>)	PCR-Produkt + pMW174
pMT504	Derivat von pGem-7Zf(+) Promega mit G-less Kassette für <i>in vitro</i> Transcription	Ming Tan, 1996
pMW224	381 bp <i>EcoRI/EcoRV</i> <i>nuo</i> -Promotor in pMT504 (<i>nuoP1_{arc1wt}-Gless</i>)	PCR-Produkt + pMT504
pMW225	381 bp <i>EcoRI/EcoRV</i> <i>nuo</i> -Promotor in pMT504 (<i>nuoP1_{arc1abcd}-Gless</i>)	PCR-Produkt + pMT504
pMW239	171 bp <i>EcoRI/EcoRV</i> <i>nuo</i> -Promotor in pMT504 (<i>nuoP2_{arc2wt}-Gless</i>)	PCR-Produkt + pMT504
pMW240	171 bp <i>EcoRI/EcoRV</i> <i>nuo</i> -Promotor in pMT504 (<i>nuoP2_{arc2abcd}-Gless</i>)	PCR-Produkt + pMT504
pMW241	561 bp <i>EcoRI/EcoRV</i> <i>nuo</i> -Promotor in pMT504 (<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2wt}-Gless</i>)	PCR-Produkt + pMT504
pMW242	561 bp <i>EcoRI/EcoRV</i> <i>nuo</i> -Promotor in pMT504 (<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2wt}-Gless</i>)	PCR-Produkt + pMT504

Phagen

P1 _{kc}		Miller, 1992
λRZ5	λ 'bla, 'lacZ, lacY ⁺	Ostrow <i>et al.</i> , 1986
λMW201	λ(Φ(<i>nuoP2_{arc2wt}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW201 x λRZ5
λMW202	λ(Φ(<i>nuoP2_{arc2ab}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW202 x λRZ5
λMW203	λ(Φ(<i>nuoP2_{arc2abcd}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW203 x λRZ5
λMW204	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1wt}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW204 x λRZ5
λMW205	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1ab}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW205 x λRZ5
λMW206	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2wt}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW206 x λRZ5
λMW207	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2ab}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW207 x λRZ5
λMW208	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2abcd}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW208 x λRZ5
λMW209	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2abcd}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW209 x λRZ5
λMW210	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2wt}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW210 x λRZ5
λMW214	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1abcd}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW214 x λRZ5
λMW215	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2ab}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW215 x λRZ5
λMW216	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2wt}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW216 x λRZ5
λMW252	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1abcd}P2_{arc2abcd}-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW252 x λRZ5
λMW6	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2wt}-nuoAB'-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW6 x λRZ5
λMW136	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2wt}-nuoAB'-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW136 x λRZ5
λMW158	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2ab}-nuoAB'-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW158 x λRZ5
λMW160	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2ab}-nuoAB'-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW160 x λRZ5
λMW265	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1wt}P2_{arc2abcd}-nuoAB'-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW265 x λRZ5
λMW264	λ(Φ(<i>nuoP1_{arc1ab}P2_{arc2abcd}-nuoAB'-lacZ</i>)hyb, bla ⁺	pMW264 x λRZ5

3.2. Medien und Zucht

Zucht von *Escherichia coli*

Für alle genetischen Arbeiten sowie für Vorkulturen (5 ml) wurden die Bakterien in LB-Medium gezüchtet, dem nach Bedarf Antibiotika zugesetzt wurden. Bei Zugabe von zwei Antibiotika wurde deren Konzentration jeweils halbiert.

Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte die Zucht in M9-Medium mit den jeweils angegebenen Zusätzen. Die Kulturen wurden mit 0,25 % Inokulum (aerob) bzw. 1 % Inokulum (anaerob) beimpft. Bei aerobem Ansatz wurden 20 ml Kultur in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 180 Upm geschüttelt (Innova 4000, New Brunswick Scientific). Für die anaeroben Zuchten wurden 5 ml Kulturlösung in gasdichten Sovirell-Röhrchen 3 x 15 min evakuiert und anschließend mit 1,2 atm Stickstoff begast und bei 37°C inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte in der Regel bei einer OD_{578nm} von 0,6-0,8.

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g/l Pepton (Gibco, Nr.140)

5 g/l Hefeextrakt (Gibco)

5 g/l NaCl

LB Agar:

LB-Medium mit 15 g/l Agar

M9-Medium (Miller, 1992):

6 g/l Na_2HPO_4

3 g/l KH_2PO_4

0,5 g/l NaCl

1 g/l NH_4Cl

10 ml/l $CaCl_2$, 10 mM

1 ml/l $MgSO_4$, 1 M

10 ml/l säurehydrolysiertes Casein (Serva, Nr. 48614), 10 %

5 ml/l L-Tryptophan, 1 %

Antibiotikazusätze (Endkonzentration):

100 μ g/ml Ampicillin

50 µg/ml Kanamycinsulfat

50 µg/ml Spectinomycin

20 µg/ml Chloramphenicol

15 µg/ml Tetracyclin

P1_{kc}-Phagenvermehrung

R-Agar (Miller, 1992):

10 g/l Bacto Trypton (Difco)

1 g/l Hefeextrakt (Gibco)

8 g/l NaCl

1 g/l Glucose

12 g/l Agar (Difco)

R-top-Agar:

wie R-Agar, aber 6,5 g/l Agar (Difco)

10 ml/l MgSO₄, 1 M

10 ml/l CaCl₂, 0,5 M

nach dem Autoklavieren zugesetzt

λ-Phagenvermehrung

TB-Medium (Miller, 1992):

10 g/l Pepton (Gibco, Nr. 140)

5 g/l NaCl

TB-Agar:

TB-Medium mit 10 g/l Agar

TB-top-Agar:

TB-Medium mit 6,5 g/l Agar

YM-Medium:

TB-Medium

20 ml/l Maltose, 10 %

10 ml/l Hefeextrakt (Gibco), 1 %

LB-Amp-Citrat-X-Gal-Agarplatten:

- LB-Medium
- 25 µg/ml Ampicillin
- 20 mM Na₃-Citrat
- 20 µg/ml X-Gal
- 15 g/l Agar

3.3. Molekulargenetische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Herstellung elektrokompenter Zellen und die Transformation erfolgte nach Farinha *et al.* (1990). Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach der Methode von Chen und Kuo (1993). Die analytische Isolierung von Plasmiden wurde nach der „Boiling-lysis“-Methode von Holmes und Quigley (1981) durchgeführt. Dabei wurden 1,5 ml Übernachtskultur verwendet und in 40 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA) resuspendiert. Die präparative Isolierung erfolgte entweder mit dem Nucleobond System der Firma Macherey-Nagel, dem Qiaprep-Spin (Mini), Qiaprep (Midi) oder Qiafilter (Maxi) System der Firma Qiagen. Dazu wurden 5 bis 250 ml Kultur verwendet. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der Nucleo Extract Kit (Macherey-Nagel) oder der Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder Nucleospin Kit (Macherey-Nagel). Ligationen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt und erfolgten über Nacht bei 16°C. Dabei betrug das Verhältnis von Vektor zu Insert ungefähr 1:3. Die verwendeten Restriktions-enzyme stammten von den Firmen Boeringer, Fermentas und Pharmacia.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde im Progene Thermocycler (Techne) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 50 µl enthielt je 10 pmol Primer (Tab. 2; Abb. 7), ca. 100 ng DNA-Matrize, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-Mix, 1U Tfl-DNA-Polymerase (Biozym) oder 1 U Taq-DNA-Polymerase (Gibco) und Reaktionspuffer in einfacher Konzentration. Zur Amplifizierung wurden folgende Zyklen durchgeführt:

	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation
1 x	95°C 3 min,	57-62°C 40 s,	72°C 2,5-6 min
30 x	94°C 30 s,	57-62°C 40 s,	72°C 2,5-6 min
1 x	94°C 30 s,	57-62°C 40 s,	72°C 10 min

Für Klonierungen wurde für die PCR-Reaktion die PLATINUM *Pfx*-DNA-Polymerase von Gibco verwendet. Ein Reaktionsansatz enthielt je 15 pmol Primer, ca. 100 ng DNA-Matrize, 1 mM MgCl₂, 0,3 mM dNTP-Mix, 1-2,5 U PLATINUM *Pfx*-DNA-Polymerase (Gibco) und Reaktionspuffer in einfacher Konzentration. Zur Amplifizierung wurden folgende Zyklen durchgeführt:

	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation
1 x	94°C 2 min,	58-60°C 30 s,	68°C 2,5 min
30x	94°C 15 s,	58-60°C 30 s,	68°C 2,5 min
1 x	94°C 15 s,	58-60°C 30 s,	68°C 10 min

Je nach Länge der zu amplifizierenden DNA und Schmelzpunkten der verwendeten Primer wurde das jeweilige Programm modifiziert. Für je 1000 zu amplifizierende Nukleotide wurde 30 sek Elongationszeit eingesetzt. Der Schmelzpunkt T_m der Primer wurde nach folgender Formel berechnet: $69,3 + 0,41 \times GC \% - 650/n$; n = Anzahl der Nukleotide. Die Hybridisierung wurde 2°C unter dem niedrigsten T_m -Wert der beiden Primer durchgeführt

Tab. 2: Verwendete Oligonukleotide für PCR und in vitro Transkription (MWG Biotech, Ebersberg, HPSF gereinigt). Eingeführte Schnittstellen sind rot gekennzeichnet.

Primer	Sequenz (5' → 3')	T_m [°C]	Zielstelle
<i>nuo1</i>	GTAGCGCCGAATTCACTGCTCAC	66,4	<i>nuo</i>
<i>nuo2</i>	CCGGAAGGGGAGAATTCATTGTTGATTG	65,1	<i>nuo</i>
<i>nuo3</i>	GGGGGGAGGAATTCACACAAATTCC	64,6	<i>nuo</i>
<i>nuo4</i>	CAGATCCTTGACGAATTCAGGATAATTAG	62,4	<i>nuo</i>
<i>nuo5BamHI</i>	CAGATCCTTGACTCCAGGATCCCTTAG	68,1	<i>nuo</i>
<i>nuo6EcoRI</i>	CTAATTATCCTGAATTCGTCAAGGATCTG	62,4	<i>nuo</i>
<i>nuo7BamHI</i>	GATGGACGCCACATGGATCCATGGG	67,9	<i>nuo</i>
<i>nuovorne</i>	CTGCAGGAATTCGATATCGAGTAATCG	63,4	<i>nuo</i>
<i>nuo11BamHI</i>	GTCGACGGTATGGATCCATGGG	64,0	<i>nuo</i>
<i>nuoinvitro1</i>	GATTGAAAGGGAATTCGAGTAATCG	59,7	<i>nuo</i>
<i>nuoinvitro2</i>	GGGGAGGAATATTAACCTTACAATC	60,7	<i>nuo</i>
<i>nuoinvitro3</i>	GTCGACGGAAATATTAGATGTTGTTG	59,7	<i>nuo</i>
<i>lacZ</i>	TGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	60,3	<i>nuo</i>
YZ1NarI	CAAGGAGATCCATATGAGTAATCAGGAACC	65,4	<i>nuo</i>
YZ2NarI	CTGGGAACCGAATTCAGAAAATGCGCTC	66,6	<i>nuo</i>
Mlc1	GGGAGTATGCGGTGGTTGCTG	63,7	<i>mlc</i>
Mlc2	GTTAACCTGCAACAGACGAATCAAC	63,2	<i>mlc</i>
NagC1	GAGAAAGTATGACACCAGGCGG	62,1	<i>nagC</i>
NagC2	GCACATTAATTTCCAGCAAATGCTGG	61,9	<i>nagC</i>
IHF1	GAACCGGAGGAATCATGACCAAG	62,4	<i>ihf</i>
IHF2	AACTTAACCGTAAATATTGGCGCGATC	61,9	<i>ihf</i>

resuspendiert. Jeweils 0,1 ml dieser Bakteriensuspension wurde mit 0,1 ml λ -Phagenverdünnung (1:1000) infiziert (30 min, 37°C) und anschließend mit 3 ml TB-top-Agar auf TB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C bebrütet, bis die Bakterien konfluent lysiert waren. Nach Zugabe von 2 ml SM-Puffer und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit zusammen mit dem Top-Agar in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt. Diese Suspension wurde mit 0,5 ml Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (10.000 x g, 15 min, 4°C). Die Phagen im zellfreien Überstand wurden nun abgenommen, mit 50 μ l/ml Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert. Der Titer eines so hergestellten Phagenlysats betrug ca. 10^{10} p.f.u./ml. (plaque forming units).

Herstellung rekombinanter λ RZ5 Lysate und Lysogenisierung von *E. coli* Stämmen

Zur Gewinnung rekombinanter λ -RZ5 Phagen mit *lacZ* Fusionen wurde eine Übernachtskultur von MC4100 mit dem entsprechenden Fusionsplasmid in YM Medium mit λ -RZ5 infiziert. Dazu wurden je 0,1 ml Bakteriensuspension, in SM-Puffer (20 mM Tris-Cl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄) und 0,1 ml λ -RZ5 Suspension, ca. 10^3 Phagen gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 3 ml TB-Top-Agar auf TB Agarplatten ausplattiert und bei 37°C bis zur konfluenten Lyse bebrütet. Es wurden dann 10-20 Plaques gestochen, mit 0,5 ml SM-Puffer und 25 μ l Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und dann 2 min bei 10000 x g abzentrifugiert. Zellen von MC4100 wurden mit 0,1 ml einer 10^{-4} - 10^{-6} Verdünnung dieses „Mini-Lysats“ infiziert und zur Identifizierung rekombinanter Phagen in 3 ml TB-Top-Agar mit 0,1 ml 10 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid) auf TB-Agarplatten ausplattiert und 5 bis 7 h bei 37°C inkubiert. Rekombinante Phagen bilden blaue Plaques. Blaue Plaques wurden isoliert und durch wiederholtes Ausplattieren und Isolieren von nicht rekombinanten Phagen getrennt. Von isolierten blauen Plaques wurden Plattenlysate hergestellt.

Die so gewonnenen homogenen Lysate wurden zur Konstruktion monolysogener Stämme verwendet. Dazu wurde eine Übernachtskultur des Rezipientenstammes in YM-Medium mit den rekombinanten Phagen versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die infizierten Zellen wurden auf LB-Ampicillin-Na₃-Citrat-X-Gal-Platten ausplattiert. Lysogene Stämme bilden blaue Kolonien, mehrfach Lysogene sind durch intensivere Blaufärbung zu erkennen. Durch Messung der β -Galactosidaseaktivität konnten monolysogene Stämme von mehrfach lysogenen Stämmen durch die geringere β -Galactosidaseaktivität unterschieden werden.

Transduktion mit P1_{kc}-Phagen

Zur Herstellung eines transduzierenden Phagenlysates wurden 3 ml einer Übernachtskultur des Donorstammes in LB Medium mit dem gleichen Volumen MC-Puffer (10 mM MgSO₄, 5 mM CaCl₂) versetzt und 30 min bei 37°C geschüttelt. Jeweils 0,1 ml dieser Bakteriensuspension wurde mit 0,1 ml P1_{kc}-Phagensuspension versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die infizierten Zellen wurden anschließend in 3 ml R-Top-Agar auf R-Agarplatten ausplattiert und bis zum Eintritt der konfluenten Lyse bei 37°C inkubiert. Nach Überschichten der Platten mit 2 ml LB Medium wurden die Platten 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flüssigkeit wurde zusammen mit dem Top-Agar in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit 0,5 ml Chloroform versetzt und kräftig geschüttelt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension zentrifugiert (15 min, 10000 x g, 4°C). Der zellfreie Überstand wurde abgenommen und mit 50 µl/ml Chloroform versetzt und dann bei 4°C gelagert. Der Titer solcher P1-Phagenlysate betrug ca. 10⁹ pfu/ml (plaque forming units).

Zur Transduktion wurde eine Übernachtskultur des Rezipientenstammes in LB-Medium mit gleichem Volumen MC-Puffer versetzt, 30 min bei 37°C geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation und Resuspension in 1 ml LB-Medium konzentriert. Zu 0,1 ml dieser Bakteriensuspension wurde 0,1 ml Phagensuspension, ca. 10⁶-10⁸ Phagen, und 10 µl 0,1 M CaCl₂ gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml 0,1 M Na₃-Citrat und 0,5 ml LB Medium zugesetzt und die Zellen ca. 60 min bei 37°C geschüttelt. Zuletzt wurde die Zellsuspension kurz anzentrifugiert, nach Abgießen eines Teils der Überstandes resuspendiert und auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Erfolgreich transduzierte Zellen wurden durch die erworbene Antibiotikaresistenz identifiziert. Zur Überprüfung des erfolgreichen Einbaus der Resistenzkassette wurde das inaktivierte Gen durch PCR amplifiziert und die Länge der amplifizierten DNA durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

Mutagenese der ArcA-Konsensussequenzen

Zur Konstruktion von Punktmutanten in den ArcA Bindestellen *arc1* und *arc2* wurde das Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Mit Hilfe jeweils zweier Primer (Tab. 3) wurden die ArcA-Bindestellen mutiert und zusätzliche Restriktionsschnittstellen eingeführt (Abb. 8).

In der *arc1* Bindestelle wurden die vier vorhandenen Konsensussequenzen (A/T GTTAATTA A/T) so mutiert, dass das GTT Motiv, welches in allen ArcA-Bindestellen zu 100 % konserviert vorliegt zerstört wurde. So wurden in diese Bindestelle vier Restriktionsschnittstellen eingefügt: *arc1a* mit *BclI*, *arc1b* mit *NdeI* (Wackwitz, 1999), *arc1c*

mit *NheI* und *arc1d* mit *PstI* (Abb. 8). Je nach Mutationszustand wird diese Bindestelle im folgenden als *arc1wt*, *arc1ab* oder *arc1abcd* bezeichnet.

Auch in der *arc2* Bindestelle sind vier ArcA-Konsensussequenzen vorhanden. Sie wurden nach dem selben Muster wie die der ersten Bindestelle mutiert. Daraus resultierten folgende Restriktionsschnittstellen: *arc2a* mit *ClaI*, *arc2b* mit *DraI* (Wackwitz, 1999), *arc2c* mit *BglII* und *arc2d* mit *SacI* (Abb. 8). Die Mutationen dieser Binderstelle werden als *arc2_{wt}*, *arc2_{ab}* und *arc2_{abcd}* bezeichnet.

Tab. 3: Oligonukleotide für die Mutagenese der Bindestellen (MWG Biotech, Ebersberg, HPSF gereinigt)

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	eingeführte Mutationen
<i>arc1c</i>	CGTAAATTGCTAGCTGCAGATTGCATATG GAATGACAAAAG	69,4	<i>NheI</i> (-320) (<i>arc1c</i>) <i>PstI</i> (--311) (<i>arc1d</i>)
<i>arc1crev</i>	CTTTTGTCAATTCCATATGCAATCTGCAGCT AGCAATTTACG	69,4	<i>NheI</i> (<i>arc1c</i>) <i>PstI</i> (<i>arc1d</i>)
<i>arc2c</i>	GTAAACTAATGTGAAGATCTTTTAAATAA AGTTGAC	65,1	<i>BglII</i> (-90) (<i>arc2c</i>)
<i>arc2crev</i>	GTCAACTTTATTTAAAAGATCTTCACATTA GTTTAC	65,1	<i>BglII</i> (<i>arc2c</i>)
<i>arc2d</i>	GGTTATAGAAAGGAGTAAAAGAGCTCAT CAATTAGC	66,1	<i>SacI</i> (-44) (<i>arc2d</i>)
<i>arc2drev</i>	GCTAATTGATGAGCTCTTTTACTCCTTTCT ATAACC	66,1	<i>SacI</i> (<i>arc2d</i>)

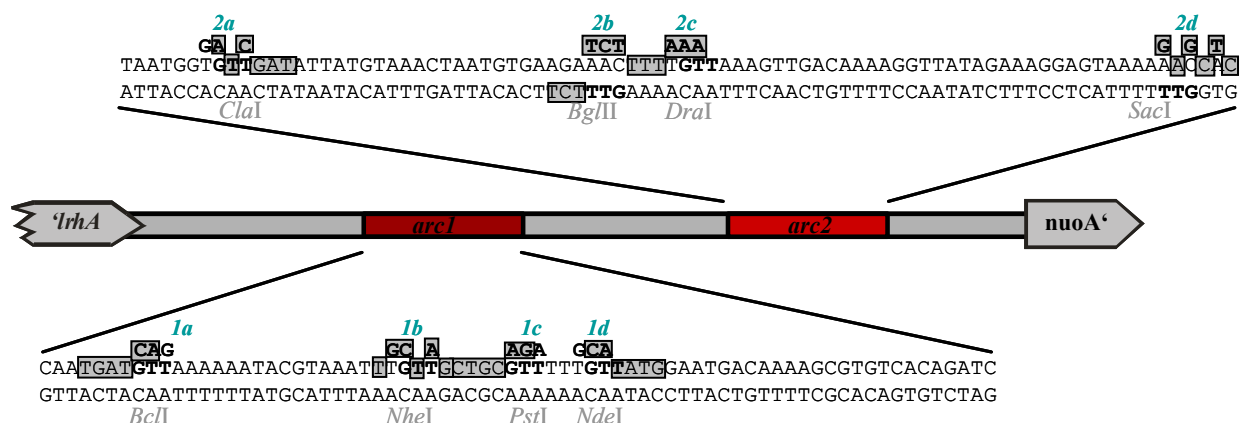


Abb. 8: Mutagenese der ArcA-Bindestellen *arc1* und *arc2*. Die Zielsequenzen für die „site-directed“-Mutagenese sind mit den jeweiligen Basenaustauschen eingekreist. Die eingeführten Restriktionsschnittstellen sind mit grauen Kästchen gekennzeichnet.

Konstruktion von Plasmiden für *in vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurden unterschiedliche *nuo*-Promotorbereiche mit den Primern *nuoinvitro1* und 2 (561 bp), *nuo6EcoRI* und *nuoinvitro2* (171bp) bzw. *nuoinvitro1* und *nuoinvitro3* (381 bp) amplifiziert und mit *EcoRI/EcoRV* in das G-less Plasmid pMT504 (Tan *et al.*, 1996) kloniert (Abb. 9). Die resultierenden Plasmid pMW224 (*nuoP1_{arc1wt}*-G-less), pMW225 (*nuoP1_{arc1abcd}*-G-less) (381 bp), pMW239 (*nuoP2_{arc2wt}*-G-less), pMW240 (*nuoP2_{arc2abcd}*-G-less) (171 bp), pMW241(*nuoP1_{arc1wt}**P2_{arc2wt}*-G-less) und pMW242 (*nuoP1_{arc1abcd}**P2_{arc2abcd}*-G-less) (561 bp) enthielten entweder den kompletten *nuo*-Promotor, nur Promotor P1 oder nur Promotor P2, dies jeweils im Wildtyp oder in Mutanten mit komplett mutierten Bindestellen.

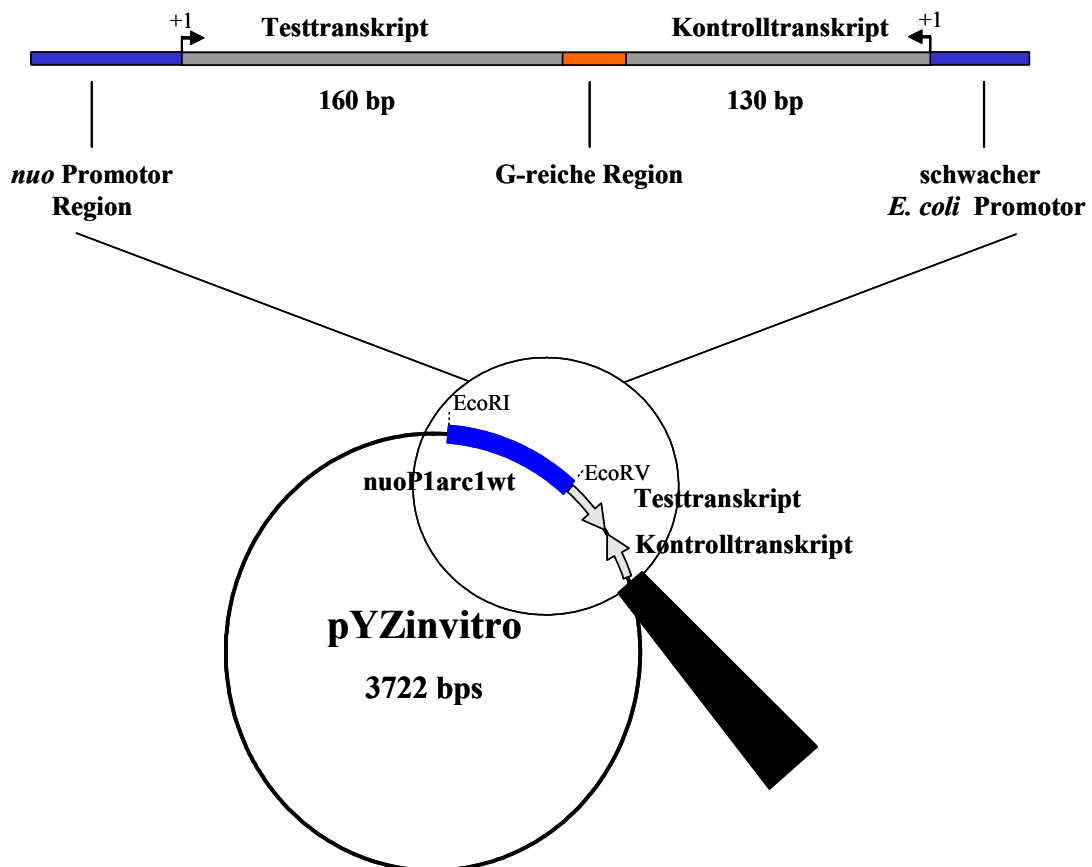


Abb. 9: Aufbau des Plasmids pMT504 für die *in vitro* Transkription. Gezeigt sind die beiden G-less Kassetten (160 bp und 130 bp, grau) und die vor die Kassetten klonierten Promotoren (blau), sowie als Transkriptionstermiation eine G-reiche Region in der Mitte (orange).

DNA Sequenzierung

Der Größenstandard für DNaseI-Footprints wurde mit dem „T7-sequencing kit“ mit pUC/M13 reverse oder universal Primer (Pharmacia) aus dem Plasmid pUC19/18 oder pKS^r hergestellt. Dabei wurde doppelsträngige DNA nach Sanger *et al.* (1977) sequenziert.

Die übrigen Sequenzierungen wurden von der Firma Genterprise, Mainz durchgeführt.

Konstruktion eines Plasmides für Überproduktion von NarL

Das *narL*-Gen wurde mittels PCR mit den Primern YZ1*narL* und YZ2*narL* aus den *E.coli* Stamm AN387 amplifiziert. Anschließend wurde das PCR Produkt mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRI* geschnitten und über *NdeI/EcoRI* in das Überexpressionsplasmid pET28a (Novagen) kloniert (Abb. 10). Mit diesem Plasmid wird das NarL Protein N-terminal mit einem His-Tag translational fusioniert, mit dessen Hilfe man das überproduzierte Protein leicht über Ni-Affinitätschromatographie reinigen kann.

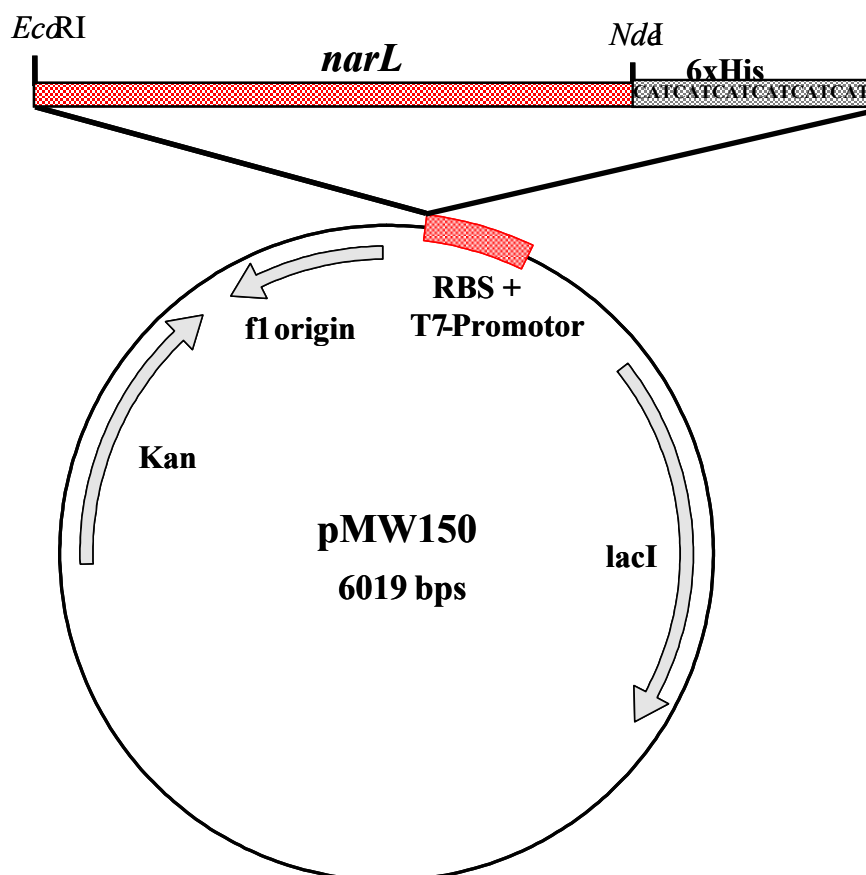


Abb. 10: NarL Überproduktionsplasmid pMW150. Über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI* wurde das mittels PCR amplifizierte NarL-Gen in das Plasmid pET28a kloniert. Die Überproduktion erfolgte mit der T7-RNA Polymerase über einen T7 Promotor.

3.4. Biochemische Methoden

Überproduktion und Proteinreinigung von ArcA-His₆

Zur Überproduktion von ArcA, wurde das rekombinante Plasmid pET28arcA-1 (Wackwitz, 1999; Strohmaier *et al.*, 1998) in *E. coli* BL21DE3 transformiert. Die Zellen wurden in LB-Medium aerob bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₅₇₈ von 0,6-0,8 wurde die Expression mit 1 mM IPTG (Roth) induziert und mittels dem T7 Promotor/Polymerase System überexprimiert. Nach 2 h Inkubation war in der Regel eine OD₅₇₈ um 1,2 erreicht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (8 min bei 6000 rpm, Sorvall GS3 Rotor, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde mit 20 ml Puffer 1 (50 mM Na/K-P_i-Puffer pH 7,0, 200 mM NaCl 10 mM Imidazol) resuspendiert und die Zellen in zwei Durchgängen in der French Presse aufgeschlossen. Das Zellhomogenat wurde durch Zentrifugation (30 min, 4°C, 12000 rpm Sorvall SS34 Rotor) in lösliche und nicht lösliche Fraktionen getrennt. Das lösliche Protein His₆-ArcA befand sich im Überstand des Zellhomogenats.

Das Protein wurde bei 4°C durch Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Agarose Säule (Qiagen) gereinigt. Das Säulenvolumen betrug 1 ml. Die Säule wurde zunächst mit 10 Vol. Puffer 1 equilibriert. Anschließend wurde die lösliche Form des Zellhomogenat aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 Vol. Puffer 2 (50 mM Na/K-P_i-Puffer, pH 7,0, 200 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 6 Volumen zu je 0,5 ml Puffer 3 (50 mM Na/K-P_i-Puffer, pH 7,0 200 mM NaCl, 500 mM Imidazol) eluiert.

Der Proteingehalt der Proben wurde durch den Proteintest nach Bradford (Roth) bestimmt. Das gereinigte ArcA-His₆ befand sich meist in Fraktion 2 und hatte in der Regel eine Konzentration von 2 µg/µl. Mit dem gereinigten Protein wurden dann Bindungsstudien und *in vitro* Transkriptionsexperimente durchgeführt.

Überproduktion und Proteinreinigung von His₆-NarL

Zur Überproduktion von His₆-NarL wurde das Überproduktionsplasmid pMW150 verwendet. Die Überproduktion und Aufreinigung erfolgte analog zu der von His₆-ArcA (siehe vorne).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der SDS-PAGE wurden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses an Natriumlaurylsulfat (SDS) elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde das Penguin Mini-System (Gibco) verwendet. Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem gleichen Volumen von SDS-Mercaptoethanol oder DTT-haltigem Probenauftragspuffer

versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 110 V über 90 Minuten. Anschließend wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung (0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250, 7 % Essigsäure, 50 % Methanol) für etwa 30 min gefärbt. Um einen klaren Hintergrund zu erhalten, erfolgte die Entfärbung in einer Lösung aus 10 % Eisessig, 20 % Methanol in Aqua bidest.

Messung der β -Galactosidaseaktivität

Die Messung der β -Galactosidaseaktivität wurde nach Miller (1992) durchgeführt. Bei anaerober Zucht wurden 5 ml Kulturvolumen, bei aerober Zucht 20 ml Kulturvolumen angesetzt. Die Zellen wurden während der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{578nm} von 0,6-0,8 geerntet und unmittelbar gemessen. Alle β -Galactosidase-Tests wurden aus mindestens sechs unabhängigen Zuchten durchgeführt. Dabei wurden jeweils vier Parallelbestimmungen durchgeführt.

Horizontale Isoelektrische Fokussierung (IEF)

a) Isoelektrische Fokussierung

Zur Trennung von NarL und NarL-P wurde die horizontale IEF mit pre-cast-Gelen und den dazugehörigen Carrier-Ampholyten (SERVALYT PreCotes) durchgeführt. PreCotes sind dünne Polyacrylamidgele auf einer Polyesterträgerfläche (Serva). Um eine vollständige Denaturierung des Proteins zu erhalten, wurden die Gele (pH 4-6) zuvor 1 h auf dem Schüttler in Harnstoff-Äquibrierungslösung bei max. 50 U/min (Wackwitz, 1999) inkubiert. Die IEF wurde (wie vom Hersteller empfohlen) auf dem Flachbrett Apparat FBE3000 (Pharmacia) mit dem Mikrocomputer power supply (Biotech/Fischer) durchgeführt. Nach der IEF wurden die PreCotes von der Kammer entfernt und fixiert.

IEF Lauf Bedingungen:

Setting	2000 V	20 W	6 mA	1 h
Start	2000 V	1 W	6 mA	2 h
Ende	2000 V	8 W	3 mA	1 h

Harnstoffäquibrierungslösung:

- 24 g Harnstoff
- 25 ml H₂O
- 5 ml SERALYT-Lösung pH 4-6

b) Färben des IEF-Gels

Die Proteinfärbung der IEF Gele wurde mit SERVA Violet 17 (Kat. Nr. 35072) laut Vorschrift des Lieferanten durchgeführt. Zuerst wurden die Gele für 20 min in 100 ml einer 20 % TCA Lösung fixiert. Nach kurzem Spülen mit Destaining Lösung (3 % Phosphorsäure, 100 ml) wurden die Gele für 10 min in 100 ml Färbelösung (0,5 g SERVA Violet 17 in 10 % Phosphorsäure) bei leichtem Schütteln (50 U/min) gefärbt. Zum Entfärben wurden die Gele für zweimal 10 min in 100 ml Destaining Lösung gewaschen. Wenn die Gele einen klaren Hintergrund hatten, wurden sie noch zweimal (2 min) mit Aqua bidest gespült und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

Radioaktive Markierung von DNA für Gelretardationsanalysen

Für Gelretardationsexperimente wurden verschiedene *nuo*-Promotor Bereiche (Abb. 15) mittels PCR amplifiziert (Tab. 2). Die unterschiedlichen Fragmente wurden mit *EcoRI* oder *EcoRI/BamHI* restringiert und an den beiden Enden radioaktiv mit [α -³³P]-dATP markiert.

Für DNaseI-Footprints ist die Markierung von nur einem DNA Ende notwendig. Dazu wurde der *nuo*-Promotor in pBlueKS⁻ kloniert. Aus den resultierenden Plasmiden pMW5 und pMW217 (Tab. 1) konnten *EcoRI/SalI*-Fragmente gewonnen werden, die an den beiden Enden mit Klenow Polymerase und [α -³³P]-dATP radioaktiv markiert wurden. Nach Restriktionsverdau dieser doppelt markierten Fragmente mit *ClaI* erhielt man ein am nichtcodierenden Strang markiertes Fragment, welches in die Footprintreaktion eingesetzt wurde.

Markierungsreaktion:

ca. 2 pmol DNA-Fragment

1 x Klenow-Reaktionspuffer (MBI Fermentas)

0,1 mM dNTP-Mix CGT

22 μ Ci [α -³³P]dATP

1U Klenow-Fragment exo⁻

Die Ansätze wurden jeweils 30 min bei 30°C und 10 min bei 75°C inkubiert und die markierte DNA anschließend mit dem Nucleotide Removal Kit (Qiagen) gereinigt.

Gelretardation von DNA-Protein-Komplexen

Gehen DNA und Proteine Wechselwirkungen ein, entstehen Protein-DNA-Komplexe, die anhand von Gelretardationsexperimenten ('mobility shift') untersucht werden können.

Gelretardationsanalysen von ArcA wurden nach der Methode von Drapal und Sawers 1995a durchgeführt. Unterschiedliche ArcA (0-5 μ M) Konzentrationen wurden mit 20 ng markierter DNA 30 min bei 4°C inkubiert, bevor sie auf ein 6 %iges (bzw. 5 %iges) nicht denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurde. Als Laufpuffer diente 1 x TBE. Nach einem 30 minütigen Vorlauf bei 100 Volt wurde die Elektrophorese der Proben 105-120 min bei 160 Volt durchgeführt (Raumtemperatur oder 4°C).

Reaktionsmix für ArcA Gelshift:

1 x Gelshiftpuffer
 1 mM DTT
 10% Glycerin
 5 μ g unmarkierte DNA (Kalbsthymus-DNA)
 20 ng markierte DNA

10 x Gelshiftpuffer: 100 mM Tris-HCl pH 7.5
 25 mM EDTA
 500 mM KCl
 40 mM Spermidin

1 x TBE: 90 mM Tris
 90 mM Borat
 2 mM EDTA

ArcA wurde immer in phosphorylierter Form benutzt. Die Phosphorylierung wurde nach Drapal und Sawers (1995a) durchgeführt:

20 μ g gereinigtes Protein wurden in 50 mM Tris HCl pH 8.0
 0,5 mM EDTA
 10 % Glycerin
 5 mM MgCl₂

mit 50 mM Carbamoyl-Phosphat in 20 μ l für 1-2 h bei 25°C inkubiert.

DNaseI-Footprint Experimente mit dem *nuo*-Promotor

DNaseI-Footprint Experimente wurden nach Drapal und Sawers 1995a durchgeführt. Gereinigtes und phosphoryliertes ArcA Protein wurde mit den radioaktiv markierten *nuo*-Promotor-Fragmenten für 30 min bei 4°C in 50 μ l DNaseI Reaktionspuffer inkubiert.

1 x Reaktionspuffer 50 mM Tris-HCl pH 7.2
 12,5 mM MgCl₂
 1 mM EDTA
 1 mM DTT
 100 mM KCl
 20 % Glycerin

Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl einer 10 mM MgCl₂-, 5 mM CaCl₂-Lösung und 0,0075 Units (2,5 ng) DNaseI (Boehringer Mannheim). Nach weiteren 30 sec wurde die Reaktion mit 90 µl Stopplösung beendet. Die DNA-Fragmente wurden durch zweimalige Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- (25/24/1 Vol/Vol) und anschließender Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (24/1 Vol/Vol) gereinigt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen LiCl und 2,5 Volumen Ethanol gefällt und in 5 µl Stopplösung resuspendiert. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Sequenzgel (6 %ig) 2 min bei 90°C denaturiert. Als Laufpuffer diente 1 x TBE.

***In vitro* Transkription**

Die Regulation der Expression über die beiden Promotoren der *nuo*-Operons wurde durch *in vitro* Transkriptionsexperimente untersucht. Als Matrizen-DNA wurden die G-less Plasmide pMW224, pMW239, pMW241 eingesetzt. [³³P]-markierte RNA wurde in einem 30 µl Ansatz synthetisiert. Zunächst wurden 1 x *in vitro* Puffer, DNA (10 nM), 1 U RNA-Polymerase (Epicentre, Technologies, Madison, Wis.), 1 mM DTT, 10 % Glycerin, RNase-Inhibitor (35-40 U) und ArcA-P auf Eis zusammengegeben. Anschließend wurde der Mix 10 min bei 37°C inkubiert, um die Bindung der RNAP und des Proteins an die Matrizen-DNA zu gewährleisten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl Nucleotidmix gestartet.

Nach weiteren 10 min (37°C) wurde die *in vitro* Transkription durch Zugabe von 1 ml eiskalter Stopplösung beendet. Das Ergebnis der Reaktion wurde auf einem 6 %igen Polyacrylamidgel analysiert.

Verwendete Lösungen:

1 x *in vitro* Puffer : 0,1 M K-Acetat
 8,1 mM Mg- Acetat
 50 mM Tris- Acetat pH 8.0
 24 mM NH₄- Acetat

Nucleotidmix : 400 μ M CTP
400 μ M ATP
1 μ M UTP
22 μ Ci α^{33} P UTP
100 μ M O-Methyl-GTP
Heparin 0,1 mg/ μ l

Stopplösung: 0,1 ml NH₄-Acetat (5 M)
0,9 ml Ethanol (100 %)
10 mg/ml tRNA

4. Ergebnisse

4.1 Expression und Transkriptionskontrolle durch zwei Promotoren

Die Expression der Strukturgene der NADH-Dehydrogenase I (*nuoA-N*) wird durch eine Vielzahl von Regulatoren kontrolliert (Bongaerts, 1996; Wackwitz, 1999). So kann die Verfügbarkeit terminaler Elektronenakzeptoren wie O₂, Nitrat, die Art der C-Quelle wie Glucose oder Succinat, oder die Wachstumsphase die Expression von *nuoA-N* beeinflussen. Die Regulation eines Gens durch so viele Faktoren fordert einen großen intergenischen Bereich vor dem Transkriptionsstart. Neben verschiedenen Bindestellen für Regulatoren konnten im 650 bp großen intergenischen Bereich vor *nuoA* zwei Promotoren identifiziert werden, die für die Transkription des *nuo*-Operons zuständig sind (Bongaerts, 1996). Die beiden Promotoren befinden sich an Position -173 (Promotor P1) und +6 (Promotor P2) zum Startpunkt der Translation (Abb. 2). Funktion und Beitrag dieser beiden Promotoren an der Expression von *nuoA-N* wurde untersucht.

4.1.1 Beitrag von P1 und P2 zur Expression von *nuo*

Die relative Stärke der beiden Promotoren und ihre Anteile an der Expression von *nuo* wurden mit Hilfe von *in vivo* Studien untersucht. Dazu wurden Reporterfusionen hergestellt, in denen die einzelnen Promotoren und der gesamte *nuo*-Promotor mit *lacZ* als Reporter gen fusioniert war (Abb. 11).

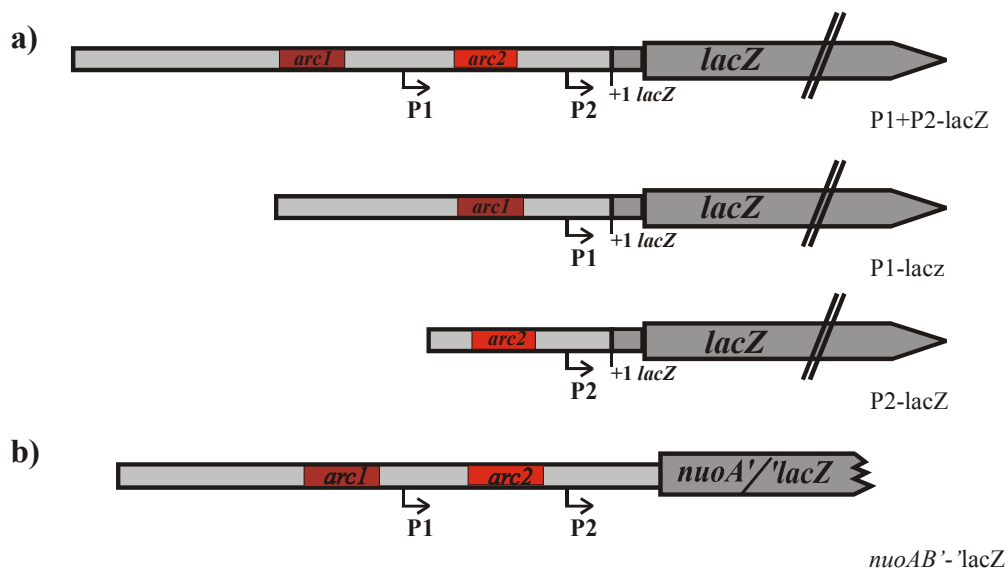


Abb. 11: Konstruktion der transkriptionellen *lacZ*-Fusionen (a) mit dem kompletten Promotor P1+P2 (598 bp), mit Promotor P1 (406 bp) und mit Promotor P2 (203 bp) und der translationellen (b) *lacZ*-Fusionen mit dem kompletten Promotor P1+P2 (*nuoAB'*-*lacZ* (650bp)). Eingezeichnet ist der Transkriptionsstart für *lacZ* (+1), die beiden Promotoren P1 und P2, sowie die Bindestellen *arc1* und *arc2* (rot).

Diese Fusionen sollten den Beitrag der einzelnen Promotoren an der gesamten Expression, und die Regulation der einzelnen Promotoren ohne Interaktion durch den Nachbarpromotor zeigen. Für die Untersuchungen wurden transkriptionelle Reporterfusionen mit *lacZ* hergestellt. Die Fusion mit dem Gesamtpromotor enthielt die gesamte intergene Region zwischen *nuoA* und *lrhA*. Die Konstrukte für die isolierten Promotoren P1 und P2 enthielten die jeweiligen Promotoren mit deren (stromauf liegenden) regulatorischen Elementen, aber keine regulatorischen Elemente des anderen Promotors (Abb. 11). Diese Fusionen wurden als P1-*lacZ*, P2-*lacZ* oder P1+P2-*lacZ* bezeichnet. Bei Bedarf wird zusätzlich angegeben, welche Bindestelle für ArcA vorhanden ist, und wie sie aufgebaut ist. P2 $arc2_{wt}$ bedeutet z.B., dass Promotor P2 mit der ArcA-Bindestelle *arc2* vorliegt, und dass sich diese im Wildtypzustand befindet (P2 $arc2_{wt}$). Diese Fusionen wurden mit Hilfe des Phagen λ RZ5 als Einzelkopie ins Chromosom von *Escherichia coli* integriert, und anschließend die β -Galaktosidaseaktivität unter verschiedenen Zuchtbedingungen untersucht.

Die Expression der 3 Reporterfusionen wurde nach Zucht mit verschiedenen Substraten (Glucose, oder Glycerin plus Fumarat) unter aeroben und anaeroben Bedingungen verglichen. (Abb. 12 und 13). Unter allen Bedingungen war P1 der stärkste Promotor und P2 sehr schwach. Die Expression des Gesamtpromotors (P1+P2) lag dazwischen. Dies zeigt bereits deutlich, dass die Expression von P1+P2 nicht die Summe der Expression der Einzelpromotoren darstellt.

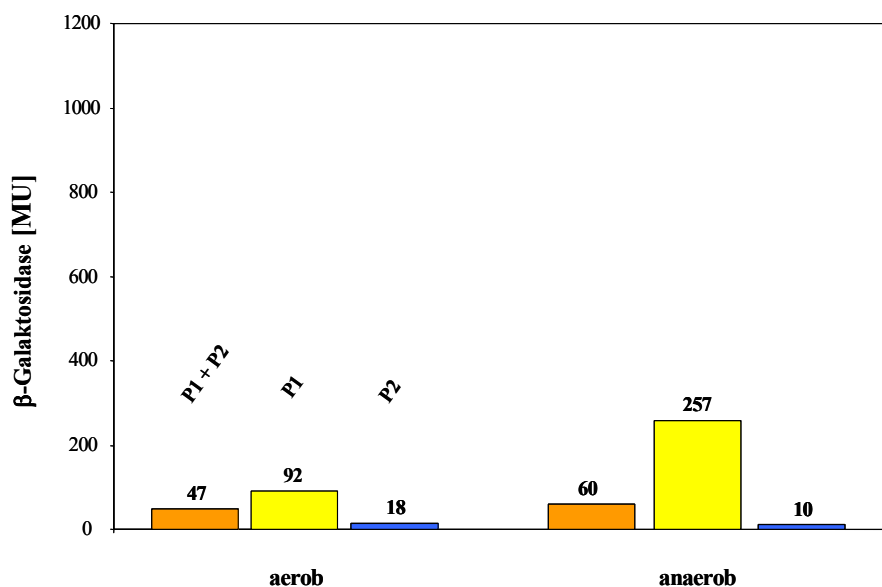


Abb. 12: Expression von Promotor P1, P2, P1+P2 von *nuoA-N* bei aerober und anaerober Zucht mit Glucose. Dargestellt sind die β -Galaktosidaseaktivitäten (Miller Units [MU]) für P1+P2 (IMW367) (orange), P1 (IMW363) (gelb) und P2 (IMW357) (blau).

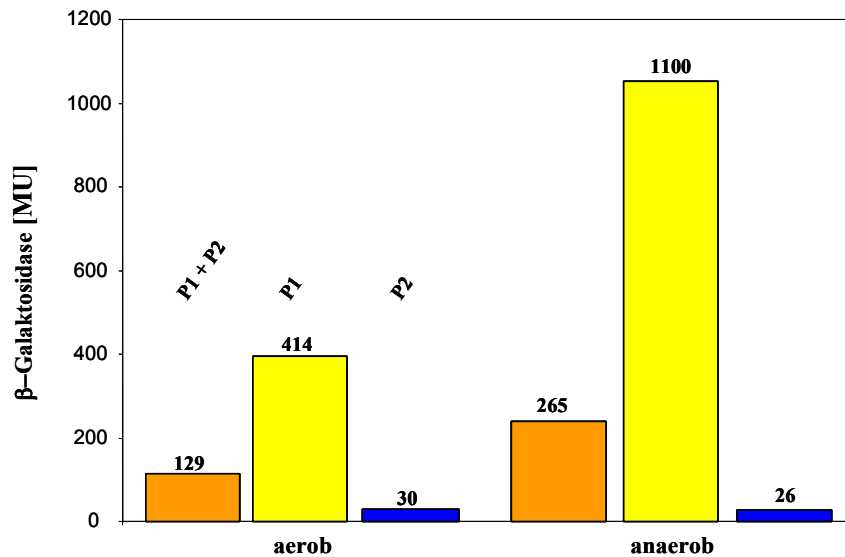


Abb. 13: Expression von Promotor P1, P2, P1+P2 von *nuoA-N* bei aerober und anaerober Zucht mit Glycerin plus Fumarat. Dargestellt sind β -Galaktosidaseaktivitäten (Miller Units [MU]) für P1+P2 (IMW367) (orange), P1 (IMW363) (gelb) und P2 (IMW357) (blau).

Die Expression von P1 und P1+P2 war unter anaeroben Bedingungen generell höher als aerob, wobei die Zunahme bei P1 stärker war (Faktor $\sim 2,7$) als bei P1+P2 (Faktor 1.3 bis 2). Die Expression von P2 wurde dagegen durch Anaerobiose nicht stimuliert. Die Substrate Glycerin und Fumarat verursachten eine Zunahme der Expression aller Fusionen in ähnlicher Weise (Faktor $\sim 4,5$) gegenüber dem Wachstum mit Glucose.

4.1.2 Einfluss der Regulatoren ArcA und IHF auf die Expression von *nuo*

ArcA und IHF sind wichtige Regulatoren der Expression von *nuo* (Bongaerts et al., 1995; Wackwitz, 1999). Für ein genaueres Verständnis ihrer Funktion am *nuo*-Promotor wurde ihr Einfluss auf die isolierten Promotoren P1 und P2 und den Gesamtpromotor mit Hilfe von transkriptionellen Reporterfusionen untersucht. Hierzu wurden wiederum transkriptionelle Reporterfusionen verwendet. In diesen Stämmen mit P1-, P2- und P1+P2-Reporterfusionen wurden durch P1-Transduktion inaktive *arcA*, *ihf* oder *arcA* und *ihf* Gene übertragen, die die intakten Gene ersetzten. Auf diese Weise wurden P1-, P2- und P1+P2-Reporterfusionen mit *arcA*, *ihf* oder *arcA ihf*-negativem Hintergrund hergestellt. Der Einfluss dieser Mutationen auf die Expression der Reporterfusionen wurde nach aerober und anaerober Zucht bestimmt (Abb. 14). Unter aeroben Bedingungen hatte keine der Mutationen einen deutlichen Effekt auf die Expression der *nuo-lacZ* Fusionen. Lediglich die *ihf* Mutation zeigte eine geringe Abnahme der Expression gegenüber dem Wildtyp in der Fusion mit dem Gesamtpromotor (P1+P2) (Abb. 14a). Anders war jedoch die Situation bei anaerober Zucht, hier zeigten alle drei Fusionen für einige der Mutationen signifikante

Veränderungen. Die Inaktivierung von *arcA* führte bei allen drei *lacZ*-Fusionen zu einer deutlichen Derepression unter anaeroben Bedingungen, die am stärksten für P2-*lacZ* (Abb. 14c) ist (Faktor 6,2) und am schwächsten für P1-*lacZ* (Abb. 14b) (Faktor 1,4). Der Effekt auf die Expression von P1+P2 lag dazwischen (Faktor 2,3).

Die Inaktivierung von *ihf* hatte dagegen auf keine der Fusionen bei anaerober Zucht einen signifikanten Effekt. Der Effekt der *arcA ihf* Doppelmutation war in allen Fällen auch geringer als für die *arcA* Mutation alleine.

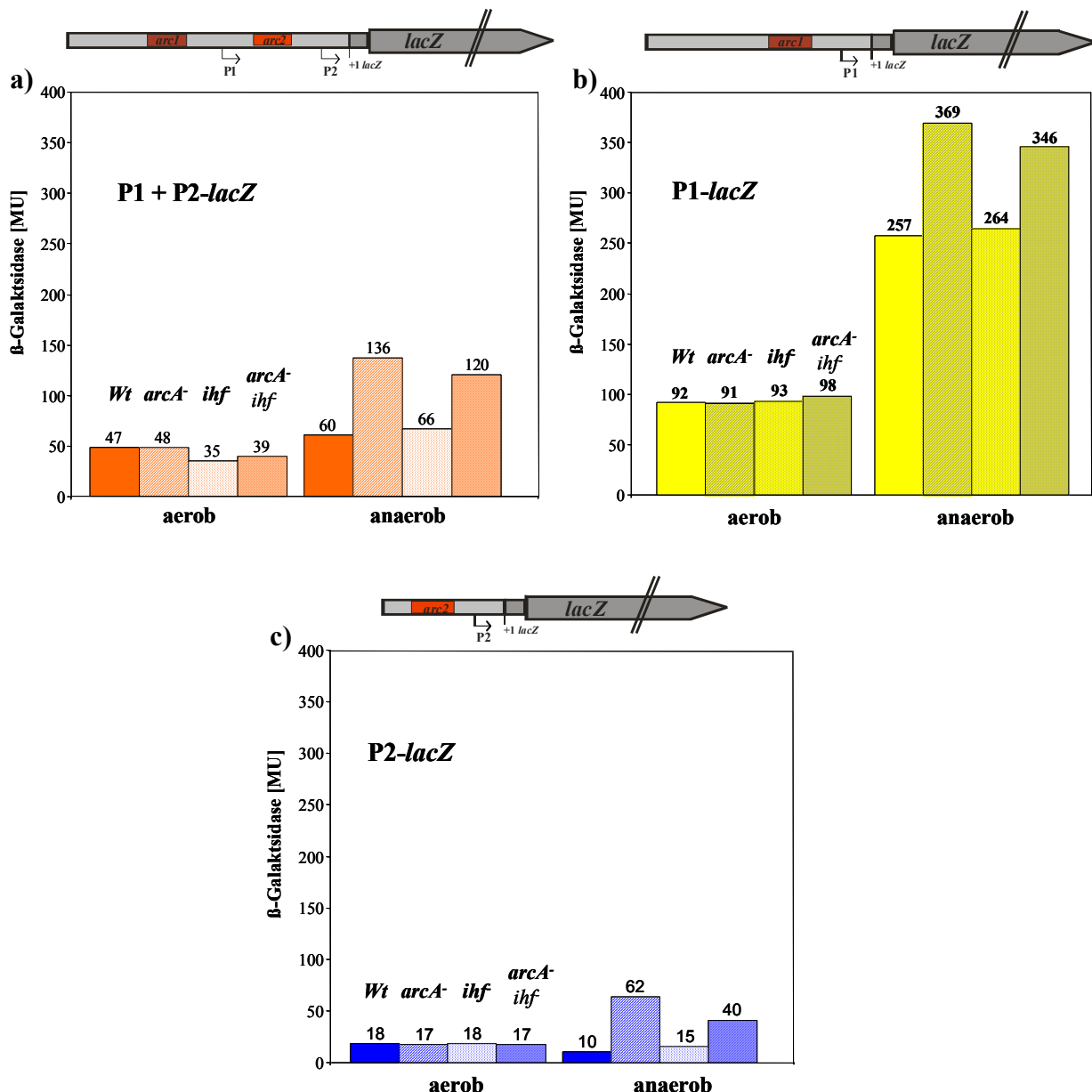


Abb. 14: Expression von Promotor P1+P2 (a), P1 (b) und P2 (c) im Wildtyp, *arcA*, *ihf* und *arcA ihf* negativem Hintergrund bei aerober und anaerober Zucht mit Glucose. Gezeigt sind Wildtyp [■] (IMW367^(a), IMW363^(b), IMW357^(c)), *arcA*-[■] (IMW386^(a), IMW364^(b), IMW358^(c)), *ihf*- [■] (IMW410^(a), IMW408^(b), IMW401^(c)) und *arcA ihf* Mutante [■] (IMW411^(a), IMW409^(b), IMW404^(c)). Außerdem sind die jeweiligen *lacZ*-Fusionen mit den *arcA*-Bindestellen (*arc1* und/oder *arc2*) (rot) dargestellt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Promotor P1 vermutlich den Hauptteil der Expression des Gesamtpromotor P1+P2 liefert und dabei nur wenig von ArcA und gar nicht IHF abhängig ist. Promotor P2 ist sehr schwach und leistet damit nur einen geringen Beitrag zur Expression. Die Expressionsdaten deuten darauf hin, dass Promotor P2 dafür aber für die anaerobe Regulation des gesamten Promotors durch ArcA und IHF verantwortlich ist.

4.2 Spezifische Bindung von ArcA an die beiden ArcA-Bindestellen

Vorhergehende Studien hatten gezeigt, dass die Expression der NADH-Dehydrogenase I unter anaeroben Bedingungen durch den Transkriptionsregulator ArcA reprimiert wird (Bongaerts et al., 1995; Wackwitz, 1999). In dem intergenischen Bereich vor *nuo* waren zwei ArcA-Bindestellen (*arc1* und *arc2*) identifiziert worden, die für diese Repression verantwortlich sind (Wackwitz, 1999). Um den Beitrag beider ArcA-Bindestellen zur Expression von *nuo* genauer zu verstehen, wurden Gelretardationsexperimente mit isoliertem ArcA-Protein an den getrennten Bindestellen durchgeführt.

ArcA wurde in *E. coli* als His₆-ArcA Fusionsprotein überproduziert und über den N-terminalen His₆-Anhang gereinigt. Durch Inkubation mit Carbamoyl-Phosphat wurde ArcA *in vitro* phosphoryliert und in der aktiven Form als aktiviertes ArcA (ArcA-P) erhalten. Der His₆-Anhang konnte durch Inkubation mit der Protease Thrombin abgespalten werden. Frühere Versuche hatten jedoch gezeigt, dass der His₆-Anhang die Funktion des ArcA Proteins nicht stört (Wackwitz, 1999). In dieser Arbeit wurde deshalb immer His₆-ArcA verwendet, das als ArcA bezeichnet wurde.

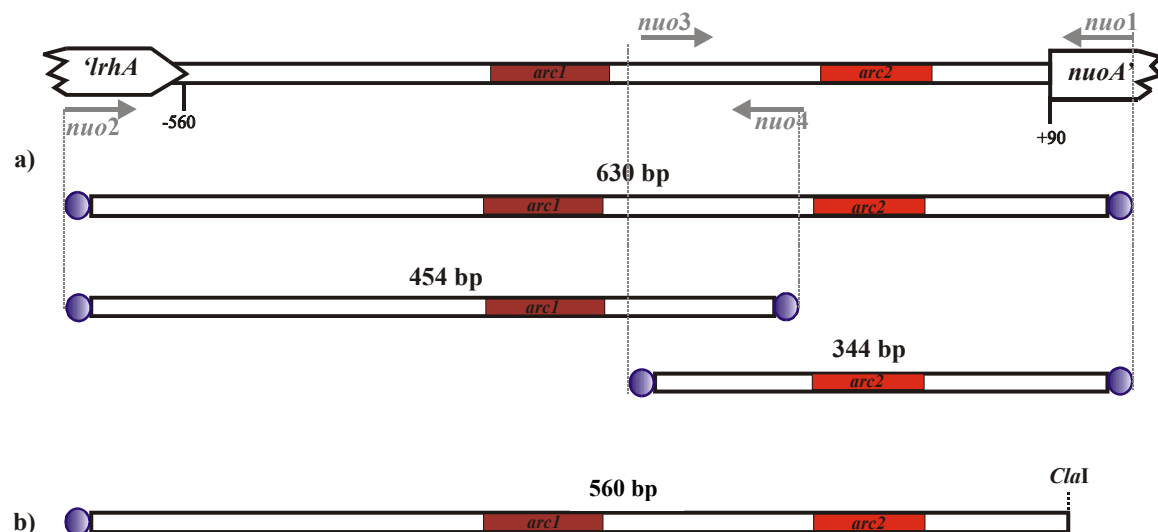


Abb. 15: Fragmente des *nuo*-Promotors für den Gelshift (a) mit dem kompletten Promotor (P1+P2 (630 bp)), mit Bindestelle *arc1* (P1 (454 bp)) oder mit Bindestelle *arc2* (P2 (344 bp)) und für den Footprint (560 bp). Die auf den Fragmenten enthaltenen ArcA-Bindestellen sind rot gekennzeichnet. Des Weiteren sind die Markierungen der Fragmente (blaue Kreise) und die Primer eingezeichnet.

Radioaktiv markierte DNA des kompletten *nuo*-Promotors (*P1arc1*+*P2arc2*) (Abb.15a) wurde mit steigenden Konzentrationen an gereinigtem, phosphoryliertem ArcA-Protein (ArcA-P) inkubiert und anschließend einer nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen (Abb. 16).

Bereits in Anwesenheit relativ niedriger Konzentrationen an ArcA-P (0,7 μ M) nahm die Bande mit freier DNA ab. Gleichzeitig bildete sich ein DNA-Protein-Komplex mit verminderter Mobilität. Diese Bande wurde als Komplex I bezeichnet. Die Inkubation mit höheren Konzentrationen an ArcA-P Protein (3 μ M) führte zur Bildung eines weiteren Protein-DNA-Komplexes (Komplex II) mit weiter reduzierter Mobilität. Die Zugabe von unspezifischer Kompetitor-DNA hatte keinen Effekt auf die Bildung der Protein-DNA-Komplexe. Dies bestätigt frühere Hinweise (Wackwitz, 1999), dass ArcA-P spezifisch an den *nuo*-Promotor bindet. Das Auftreten zweier verschiedener Protein-DNA-Komplexe könnte darauf hinweisen, dass eine aufeinanderfolgende Besetzung der beiden ArcA-Bindestellen erfolgt oder eine Oligomerisierung von ArcA-P bei höheren Proteinkonzentrationen stattfindet, die zu höherer Retardation führt.

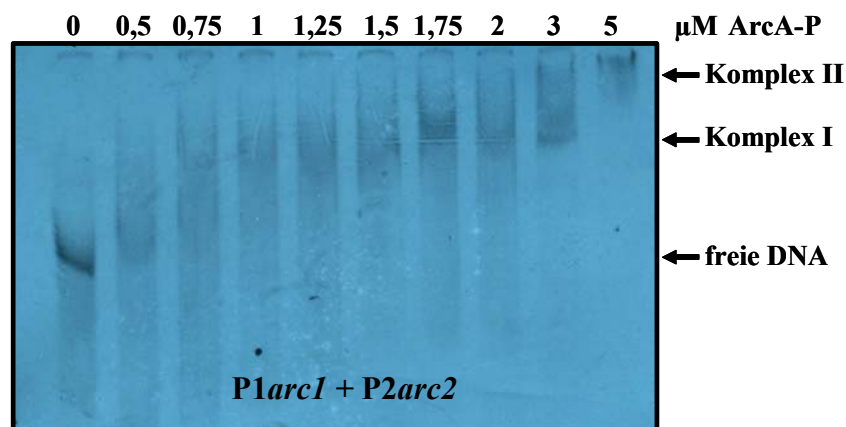


Abb. 16: Gelretardation des gesamten Promotors *P1arc1*+*P2arc2* (630 bp) durch ArcA-P. Autoradiogramm nach nativer Gel-Elektrophorese der kompletten *nuo*-Promotor DNA mit steigender Konzentration an ArcA-P.

Wegen des Vorliegens von zwei ArcA-Bindestellen am *nuo*-Promotor stellte sich die Frage, ob das ArcA-P unabhängig an die zwei Bindstellen binden kann oder ob die Bindung an eine Bindestelle notwendig ist, um die Bindung des Proteins an die zweite Bindestelle zu ermöglichen. Aus diesem Grunde wurden Fragmente des *nuo*-Promotors in die Gelretardationsversuche eingesetzt, die nur die erste Bindestelle (*P1arc1*) oder die zweite Bindestelle (*P2arc2*) trugen (Abb. 15a). Beide Promotorfragmente bildeten ArcA-P Retentionskomplexe (Abb. 17a und b). Auch bei den einzelnen Bindestellen *P1arc1* und *P2arc2* waren wieder jeweils zwei Komplexe zu erkennen.

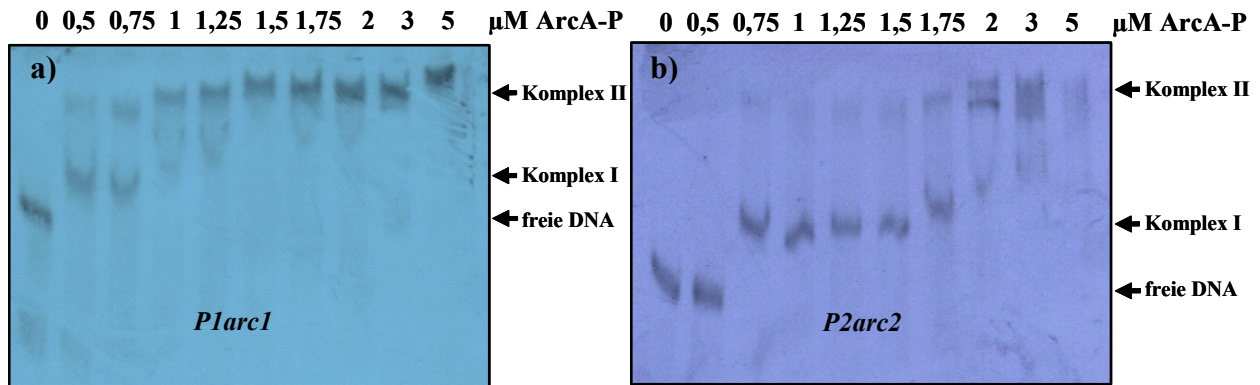


Abb. 17: Gelretardation von Promotor-DNA mit der ersten ArcA-Bindestelle *P1arc1* (454 bp) (a) und der zweiten ArcA-Bindestelle *P2arc2* (344 bp) (b) durch phosphoryliertes ArcA. Autoradiogramm nach nativer Gel-Elektrophorese der Promotor-DNA bei steigenden Konzentrationen an ArcA-P.

Aus den ArcA-P Konzentrationen, die zur Ausbildung der Komplexe benötigt werden, konnten K_D -Werte der Komplexbildung abgeschätzt werden (Tab 4). Der K_D -Wert für den ersten Komplex lag bei Bindestellen *P1arc1* bei $< 0,5 \mu\text{M}$ ArcA-P. Für Komplex I der Bindestelle *P2arc2* war eine signifikant höhere Konzentration von $0,75 \mu\text{M}$ ArcA-P notwendig. Ein Unterschied ergab sich auch für die K_D -Werte des zweiten Komplexes. Der K_D -Wert für den zweiten Komplex von *P1arc1* lag bei $1 \mu\text{M}$ ArcA-P, während für den zweiten Komplex von P2 wiederum eine signifikant höhere Konzentration von $1,75 \mu\text{M}$ ArcA-P notwendig war.

Tab. 4: Apparente K_D -Werte der Bindung von ArcA-P an die drei *nuo*-Promotorbereiche.

DNA	K_D für Komplex I	K_D für Komplex II
<i>P1arc1+P2arc2</i>	0,7	3
<i>P1arc1</i>	$< 0,5$	1
<i>P2arc2</i>	0,75	1,75

Promotorfragmente, die keine der beiden Bindestellen *arc1* oder *arc2* enthielten, wiesen keine Bindung von ArcA-P auf (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ArcA-P *in vitro* unabhängig und mit unterschiedlicher Affinität an beide ArcA-Bindestellen bindet. Das Vorkommen von zwei Protein-DNA Komplexen für die DNA-Fragmente, die nur *arc1* oder *arc2* enthalten, ist ein Hinweis dafür, dass jede der

Bindestellen für sich in Abhängigkeit von der ArcA-P Konzentration zwei verschiedene DNA-Proteinkomplexe bildet. Oligomerisierung bei hohen ArcA-P-Konzentrationen kann aber nicht ausgeschlossen werden.

4.3 Mutagenese der ArcA-Bindestellen

Die beiden ArcA-Bindestellen *arc1* und *arc2* befinden sich im gleichen Abstand stromauf der beiden Promotoren P1 und P2 (Bongaerts et al, 1995; Wackwitz, 1999) (Abb. 5). Beide Bindestellen enthalten den ArcA-Konsensus (A/TGTTAATTAT/A) (Lynch und Lin, 1996) mehrfach, der für die Bindung von ArcA an die DNA verantwortlich sein soll (Abb. 19).

In jeder der beiden Bindestellen wurden die Konsensussequenzen einzeln oder in Kombination durch Mutagenese ausgeschaltet. Diese Mutanten wurden dann daraufhin untersucht, ob *in vitro* die Bindung von ArcA-P an die DNA verändert ist, und ob *in vivo* die Expression von *nuo-lacZ* verändert ist. Die ArcA-Konsensussequenz (A/TGTTAATTAT/A) ist relativ variabel (Lynch und Lin, 1996). Am besten konserviert innerhalb dieser Konsensussequenz ist ein GTT- Motiv, dem aus diesem Grund eine besondere Bedeutung beigemessen wird. Bei der Mutagenese wurde deshalb dieses Motiv bevorzugt verändert.

In der ArcA-Bindestelle *arc1* befinden sich vier ArcA-Konsensussequenzen auf dem codierenden Strang (*arc1a*, *arc1b*, *arc1c* und *arc1d*). Sie stimmen in 8, 7, 5 bzw. 5 der 10 Nucleotide mit der Konsensussequenz überein. Die zweite ArcA-P Bindestelle *arc2* besitzt ebenfalls vier Bindemotive. Hier befinden sich zwei Sequenzen auf dem codierenden (*arc2a* und *arc2b*) und zwei auf dem nichtcodierenden Strang (*arc2c* und *arc2d*) (Abb18 und 19). Diese Konsensussequenzen zeigen 70 % Identität zu der postulierten Sequenz. Auffällig an den Konsensussequenzen des codierten Stranges von *arc1* und *arc2* ist, dass die Lage zum Ende und der Abstand zueinander innerhalb einer Bindestelle fast identisch sind.

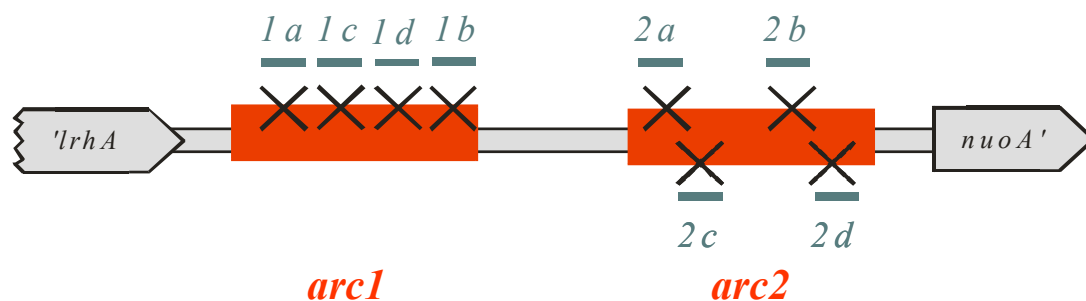


Abb. 18: Lage der Mutationen auf dem codierenden bzw. nichtcodierenden Strang der ArcA-Konsensussequenzen (1a bis 1d, 2a bis 2d) innerhalb der beiden ArcA-Bindestellen (*arc1*, *arc2*). Mutationen sind mit schwarzen X markiert, die Bindestellen rot gekennzeichnet.

Jede der Konsensussequenzen wurde durch gerichtete Mutagenese verändert. Hierzu wurden mit PCR Restriktionsschnittstellen als Mutationskontrolle in die Konsensussequenzen eingeführt. Die Primer wurden so konzipiert, dass mindestens zwei der drei stark konservierten Nucleotide im GTT-Motiv der ArcA-Bindestellen verändert wurden (Abb. 19).

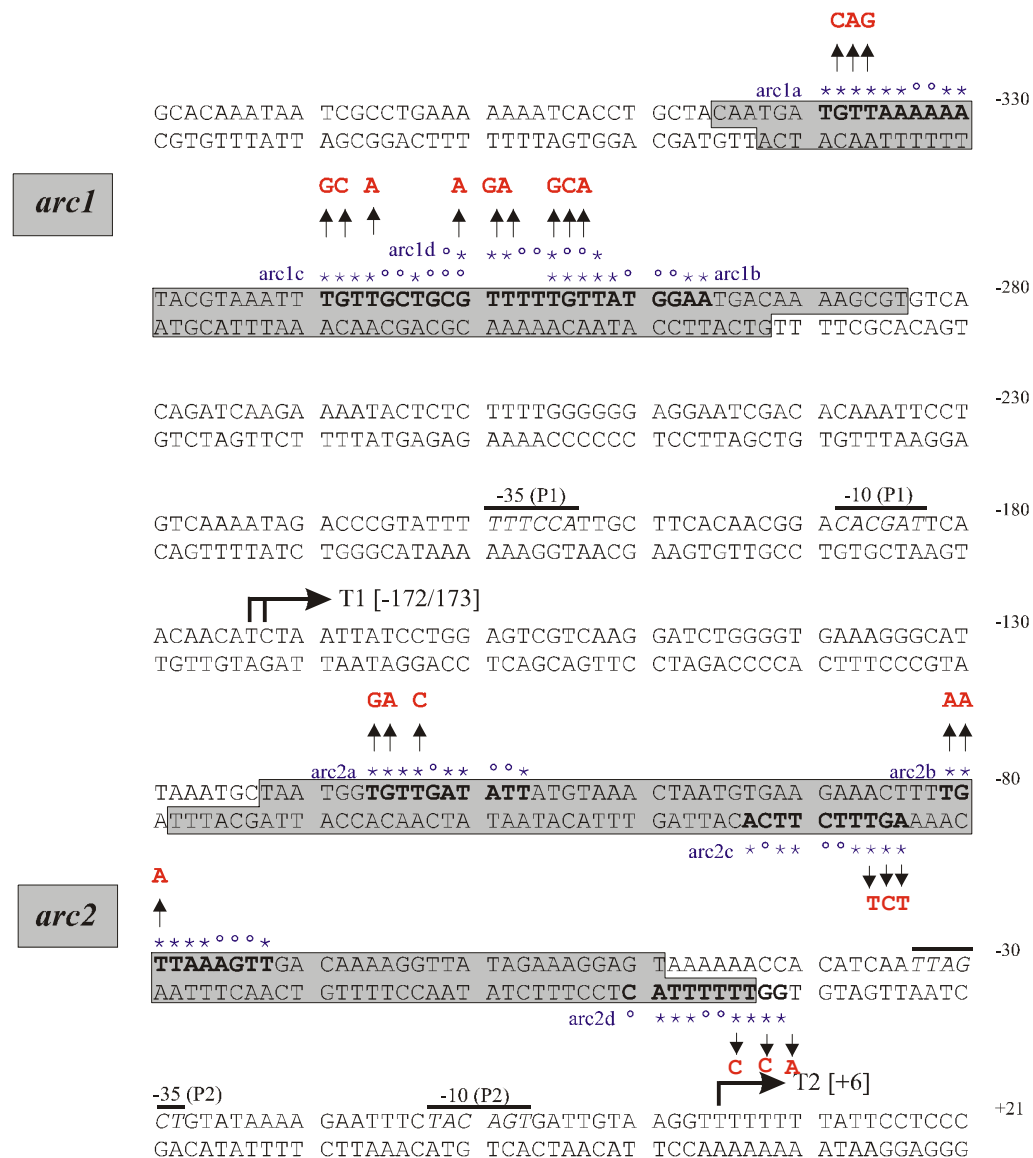


Abb. 19: ArcA-Bindestellen *arc1* und *arc2* in der *nuo*-Promotorregion. Die ArcA-Bindestellen sind grau unterlegt. Konsensussequenzen (*arc1a/b/c/d* und *arc2a/b/c/d*) (Lynch und Lin, 1996) innerhalb der ArcA-Bindestellen sind gekennzeichnet als konservierte (*) und nicht konservierte (°) Basen. Die Mutationen sind in rot dargestellt. Die Transkriptionsstartpunkte (T1 und T2) und die -10 und -35 Regionen der beiden Promotoren (P1 und P2) sind dargestellt. Die Nummerierung erfolgte nach Weidner *et al.*, 1993.

Ausgangsplasmid für die Mutationen war pMW6. Die Mutationen in *arc1ab* und *arc2ab* wurden bereits in früheren Experimenten eingeführt (Wackwitz, 1999). Mit den Primern *arc1c* und *arc1crev* wurden die beiden zusätzlichen Mutationen in die *arc1* Bindestelle eingefügt. Daraus resultierte letztlich die Mutation der ersten ArcA-P Bindestelle an

4 Positionen, die als *arc1abcd* bezeichnet wird. Mit den Primern *arc2c/arc2crev* und *arc2d/arc2drev* wurden die restlichen Konsensussequenzen in der zweiten Bindestelle mutiert. Daraus resultierte eine ebenfalls vierfach mutierte Bindestelle, die als *arc2abcd* bezeichnet wird.

Die Promotormutationen lagen in verschiedenen paarweisen Kombinationen vor (z.B. *arc1ab*, *arc1abcd*, *arc1abarc2ab*, *arc1abcdarc2abcd*), so dass von einer Zweifach- bis zu einer Achtfachmutante alle paarweisen Kombinationen vorhanden waren.

4.3.1 Bindung von ArcA-P an die mutierten ArcA-Bindestellen (Gelretention)

Der Einfluss der *arc*-Promotormutationen auf die Bindung von ArcA-P an die Promotor-DNA wurde mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten mit den mutierten DNA-Fragmenten durchgeführt (Abb. 19). Die Fragmente waren sonst identisch zu den Wildtyp DNA-Fragmenten des Experiments von Abb. 15.

Die radioaktiv markierte DNA des mutierten *nuo*-Promotors ($P1_{arc1_{ab}} + P2_{arc2_{abcd}}$) wurde mit steigenden Konzentrationen an gereinigtem und phosphoryliertem ArcA-Protein inkubiert und durch native Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt (Abb. 20). Das sechsfach mutierte *nuo*-Promotor-Fragment (Abb. 20a) wurde durch ArcA-P retardiert. Darüber hinaus traten zwei verschiedene ArcA-DNA-Komplexe mit unterschiedlicher Retention auf.

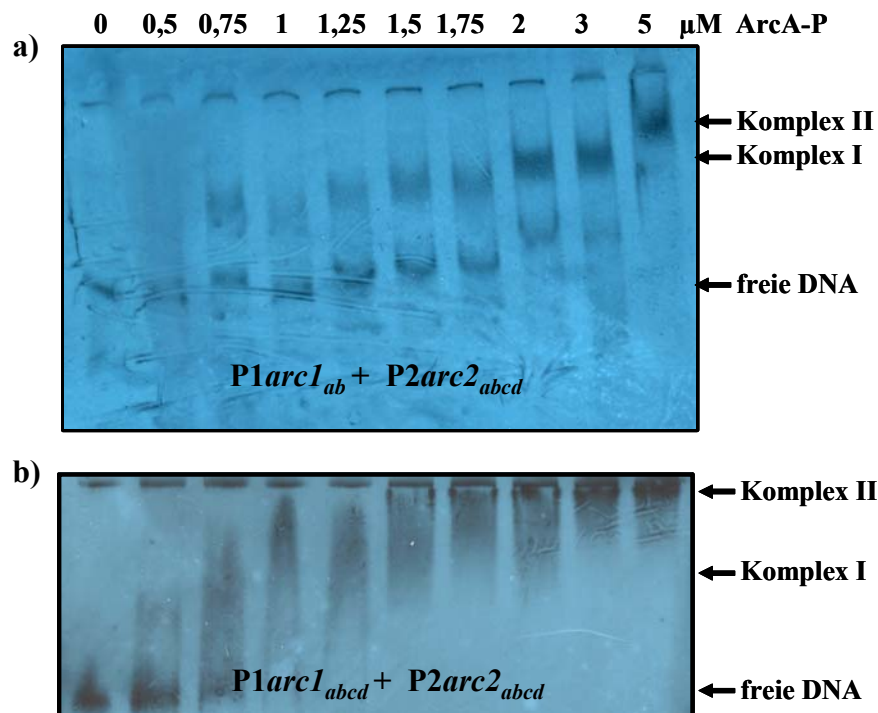


Abb. 20: Gelretardation der gesamten Promotor-DNA P1+P2 ($P1_{arc1ab} + P2_{arc2abcd}$ (a) und $P1_{arc1abcd} + P2_{arc2abcd}$ (b) (560 bp)) durch ArcA-P. Autoradiogramm nach nativer Gel-Elektrophorese mit steigender Konzentration an ArcA-P.

Im Gegensatz zum nicht mutierten Promotorfragment waren jedoch höhere Konzentrationen an ArcA-P zur Retention notwendig. So wurde der erste Komplex erst bei einem K_D von $1,5 \mu\text{M}$ ArcA-P erhalten. Auch für die zweite Stufe lag der K_D -Wert mit $5 \mu\text{M}$ deutlich über dem des unmutierten Promotors. Die K_D -Werte von ArcA-P für die Bildung von Komplex I und Komplex II war damit um die Faktoren 2,1 bzw. 1,6 erhöht (Tab. 5). In einer Achtfachmutante $P1arc1_{abcd}+P2arc2_{abcd}$ ergaben sich die gleichen K_D -Werte (Abb. 20b) gezeigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Mutation der ersten (*arc1*) und zweiten (*arc2*) ArcA-Bindestelle die Affinität von ArcA-P nicht aufgehoben, jedoch um Faktor ~ 2 verringert werden konnte.

Auf ähnliche Weise wurde der Einfluss der Inaktivierung des ArcA-Konsensus für die Bindung von ArcA-P an die einzelnen Bindungsstellen untersucht. Beide mutierten Promotor-Fragmente bildeten mit ArcA-P Retentionskomplexe (Abb. 21). Auch bei den einzelnen mutierten Bindungsstellen waren wieder zwei Komplexe zu erkennen. An der mutierten Bindestelle $P1arc1_{ab}$ wurden gegenüber der unmutierten Bindestelle $P1arc1$ höhere Konzentrationen an ArcA-P zur Retention benötigt (Abb. 21a). Der K_D -Wert für diesen ersten Komplex war um Faktor 2,5 höher als im Wildtyp $P1arc1$ (Tab. 5). Auch für den zweiten Komplex waren höhere Konzentrationen an ArcA-P notwendig (K_D $2,5 \mu\text{M}$). Die zusätzlichen Mutationen der ersten Bindestelle in *arc1cd* zu $P1arc1_{abcd}$ hatten gegenüber *arc1ab* keinen weiteren Einfluss auf die Affinität von ArcA-P (Abb. 22). Bei der mutierten zweiten ArcA-Bindestelle ($P2arc2_{abcd}$) war keine signifikant veränderte Bindung gegenüber der unmutierten Bindestelle sichtbar (Abb. 21b). Der K_D -Wert für den ersten Komplex lag wie im Wildtyp-Promotor bei $0,75 \mu\text{M}$ ArcA-P. Der zweite Komplex wurde hier bei einer Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ erreicht und war damit geringfügig gegenüber der Wildtyp-Bindestelle $P2arc2_{wt}$ erhöht (Tab. 5).

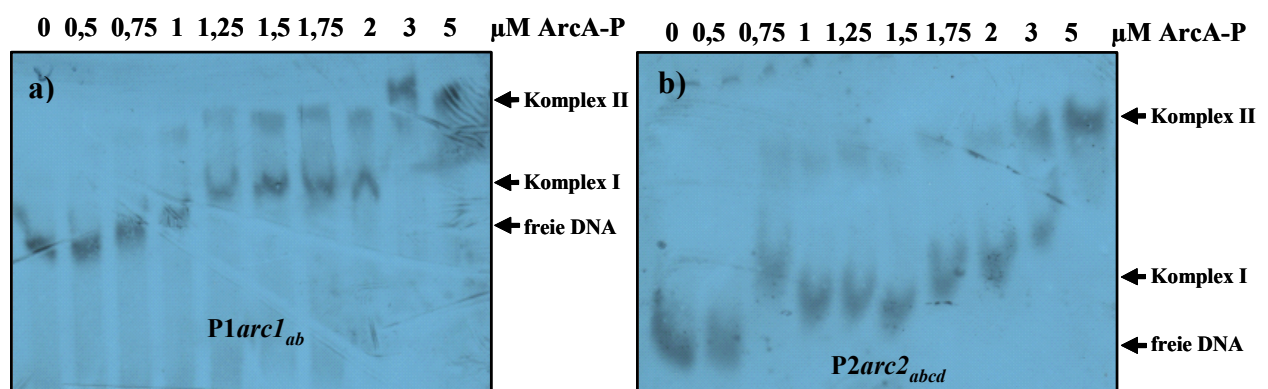


Abb. 21: Gelretardation von Promotor-DNA mit $P1arc1_{ab}$ (454 bp) (a) und $P2arc2_{abcd}$ (344 bp) (b) durch ArcA-P. Autoradiogramm nach nativer Gel -Elektrophorese bei steigender Konzentration an ArcA-P.

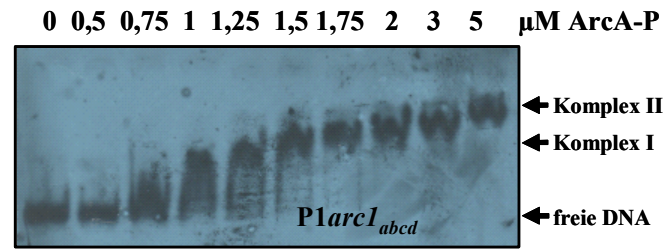


Abb. 22 Gelretardation von Promotor-DNA mit $P1arcI_{abcd}$ (454 bp) durch ArcA-P. Autoradiogramm nach nativer Gel-Elektrophorese bei steigender Konzentration an ArcA-P.

Tab. 5: Apparente K_D -Werte der Bindung von ArcA-P an die drei *nuo*-Promotor-Fragmente (P_1+P_2 , P_1 , P_2). Zusammengestellt sind die K_D -Werte für die unmutierten und mutierten Promotorfragmente aus den Abb.16, 17, 20, 21 und 22.

DNA	K_D für Komplex I	K_D für Komplex II
$P1arc1+P2arc2$	0,7	3
$P1arc1$	< 0,5	1
$P2arc2$	0,75	1,75
$P1arc1_{ab} + P2arc2_{abcd}$	1,5	5
$P1arc1_{ab}$	1,25	2,5
$P2arc2_{abcd}$	0,75	2,5

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mutationen der ArcA-Konsensussequenzen der zweiten ArcA Bindestelle *arc2* keinen Einfluss auf die Bindung von ArcA-P an diese Bindestelle haben. Dagegen verringern die Mutationen von *arc1* in den Konsensussequenzen *arc1ab* die Affinität von ArcA-P zu dieser Bindestelle um Faktor 2,5. Diese beiden Konsensussequenzen (*arc1ab*) scheinen deshalb ein wichtiges Element für die Bindung von ArcA-P an den intergenischen Bereich vor *nuoA* zu sein. Sie sind möglicherweise auch für die veränderte Bindung des kompletten Promotors $P1arcI_{abcd}+P2arc2_{abcd}$ verantwortlich.

4.3.2 Einfluss der *arcA*-Mutationen auf die ArcA-Bindestelle (DNaseI-Footprint)

Die Lage und Größe der beiden ArcA-Bindestellen vor *nuo* ist genau bekannt. (Abb. 19) (Wackwitz, 1999). Da die *arc1ab* Mutationen die Bindungsaffinität von ArcA-P verändern,

sollte durch DNaseI Footprint Experimente untersucht werden, ob auch mit dieser Methode eine veränderte Bindung von ArcA-P zu erkennen ist. Dazu wurde radioaktiv markierte Wildtyp- und mutierte Promotor-DNA (Abb. 15b) mit steigenden Konzentrationen an phosphoryliertem ArcA-Protein inkubiert und mit DNaseI behandelt (Abb. 23). Bei beiden Fragmenten war ein Schutz von *P1arc1* vor DNaseI-Verdau durch ArcA-P zu beobachten. Der geschützte Bereich umspannte in beiden Fragmenten den Bereich von -277 bis -345. In der *arc1*-Mutante war lediglich im Bereich von -324 bis -334 ein veränderter Schutz vor DNaseI-Verdau zu erkennen. In diesem Bereich waren im Wildtyp Banden zu erkennen, die in der Mutante fehlten. Auch in der *arc1bcd* war im Bereich von -301 bis -311 ein veränderter Schutz vor DNaseI-Verdau zu erkennen. In der Mutante tauchten neue Banden auf, die im Wildtyp nicht vorhanden waren.

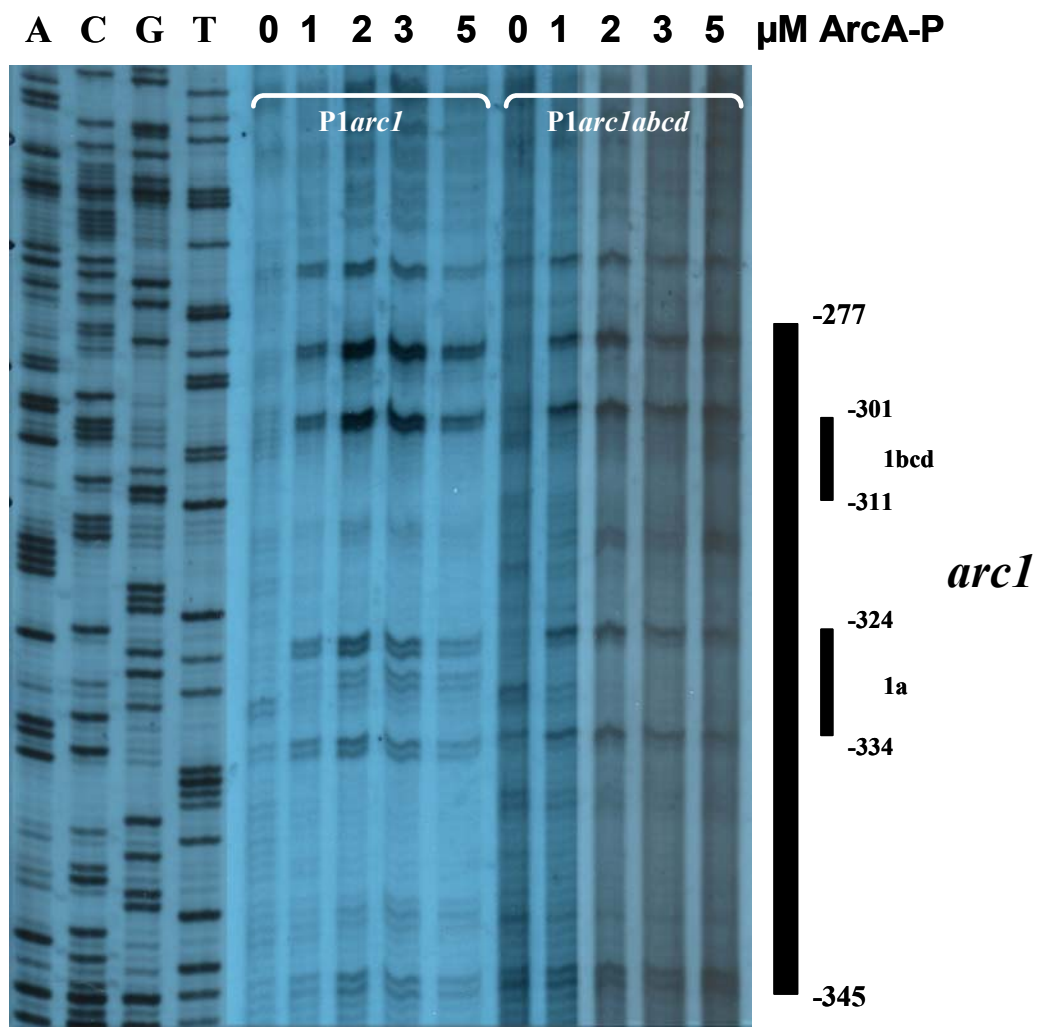


Abb. 23: DNaseI Footprint der ArcA-Bindung an die Bindestelle *arc1*, im Vergleich von Wildtypzustand (*P1arc1*) zu komplett mutiertem Zustand (*P1arc1_{abcd}*). Die Fragmente wurden mit steigenden Konzentrationen an ArcA-P inkubiert und mit DNaseI verdaut. Die geschützte Region beider Fragmente ist durch den schwarzen Balken, die mutierten Konsensussequenzen *1a* und *1bcd* sind durch die beiden kurzen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Nummerierung wurde nach Weidner et al., 1993 vorgenommen. Als Standard (A, C, G und T) wurde ein nach Sanger et al., 1977 sequenziertes Fragments benutzt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ArcA-P trotz Mutation der Konsensussequenzen der Bindestelle *arc1* (*labcd*) noch an den gleichen Bereich bindet wie im Wildtyp. Lediglich in dem mutierten Bereich von *arc1a* (Bp -324 bis -334) and *arc1bcd* (Bp -301 bis -311) selbst scheint die Bindung von ArcA verändert zu sein, da hier das Bandenmuster des DNaseI-Verdaus gegenüber dem Wildtyp verändert ist.

4.3.3 Auswirkung der Inaktivierung von *arc1* und *arc2* auf die Expression von *nuo*

4.3.3.1 Transkriptionelle Fusionen

Die Auswirkung der verschiedenen Mutationen in *arc1* und *arc2* auf die Expression der NADH-Dehydrogenase I und auf die getrennten Promotoren P1 und P2 sollte untersucht werden. Dazu wurden Reporterfusionen hergestellt, in denen die einzelnen Promotoren und der gesamte *nuo*-Promotor mit dem promotorlosen *lacZ*-Gen fusioniert waren. Zusätzlich waren die beiden ArcA-Bindestellen in verschiedenen Kombinationen mutiert. Damit sollte geprüft werden, ob durch die Punktmutationen die Regulation durch ArcA und die Expression beeinflusst wird (Abb. 24). Die Fusionen wurden mit Hilfe der Phagen λ in Einzelkopie in das Chromosom gebracht. Die β -Galaktosidaseaktivität wurden nach aerober und anaerober Zucht mit Glucose im Wildtyp und *arcA*-negativem Hintergrund bestimmt.

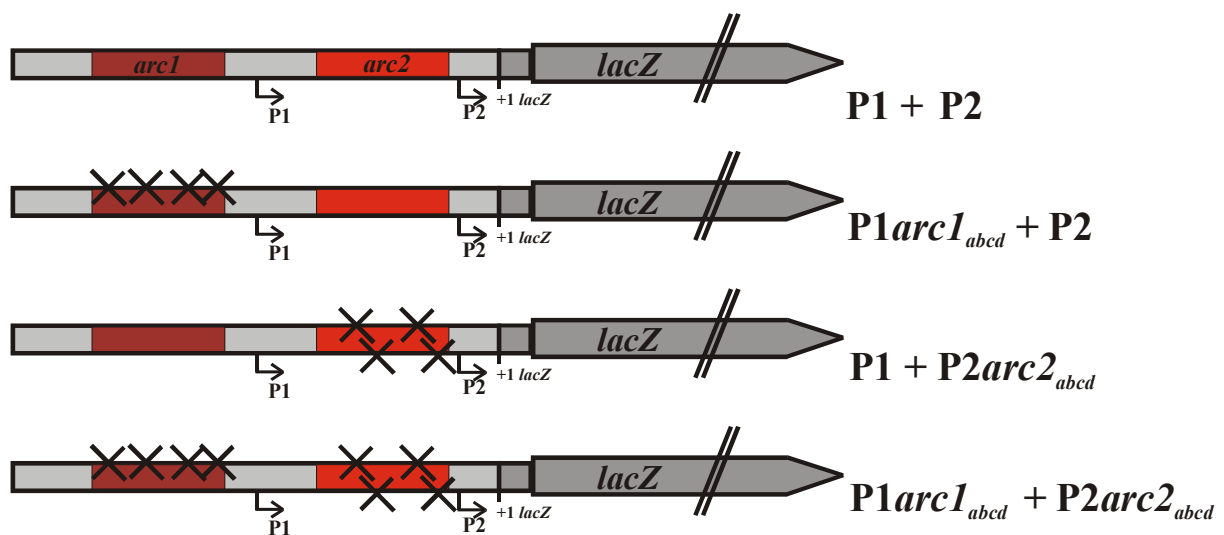


Abb. 24: Transkriptionelle Fusionen im Wildtyp und mit Mutationen in Promotor P1*arc1*_{abcd} und/oder P2*arc2*_{abcd}. Die beiden ArcA-Bindestellen (*arc1* und *arc2*) sind rot dargestellt, eingeführte Mutationen mit schwarzem X gekennzeichnet. Eingezeichnet sind auch der Transkriptionsstartpunkt von *lacZ* und die beiden Promotoren P1 und P2.

Die Expression des Gesamtpromotors (P1+P2) zeigte bei aerober Zucht nur Änderungen, wenn der Promotor in P2 (*P2arc2_{abcd}*) mutiert wurde, nicht aber bei Mutationen in P1 alleine (Abb. 25). Mutationen in P1 (*P1arc1_{abcd}*) hatten nur einen Effekt, wenn zusätzlich P2 mutiert war. Die Expression dieser Promotoren war dabei im Wildtyp und der *arc*-Mutante identisch. Ein anderes Bild ergab sich bei anaerober Zucht. Hier hatten sowohl die Mutationen in *P1arc1_{abcd}* als auch die *arcA*-Mutationen einen deutlichen Effekt. Im Wildtyphintergrund zeigte nur die *arc1*-Promotor-Mutation eine deutliche Derepression gegenüber dem Wildtyp-Promotor. In der *arcA*-Mutante dagegen waren alle Promotoren dereprimiert, d.h. sowohl der Wildtyp als auch die Promotoren, die in *P1arc1_{abcd}* oder *P2arc2_{abcd}* mutiert waren. In Promotor P1 war die Derepression bereits in *arc1_{ab}* zu erkennen und wurde durch Mutationen in *arc1_{cd}* nicht weiter gesteigert. Hier wurden nur die Ergebnisse mit den komplett mutierten Bindestellen ausgewählt. Die restlichen Ergebnisse sind im Anhang wiedergegeben.

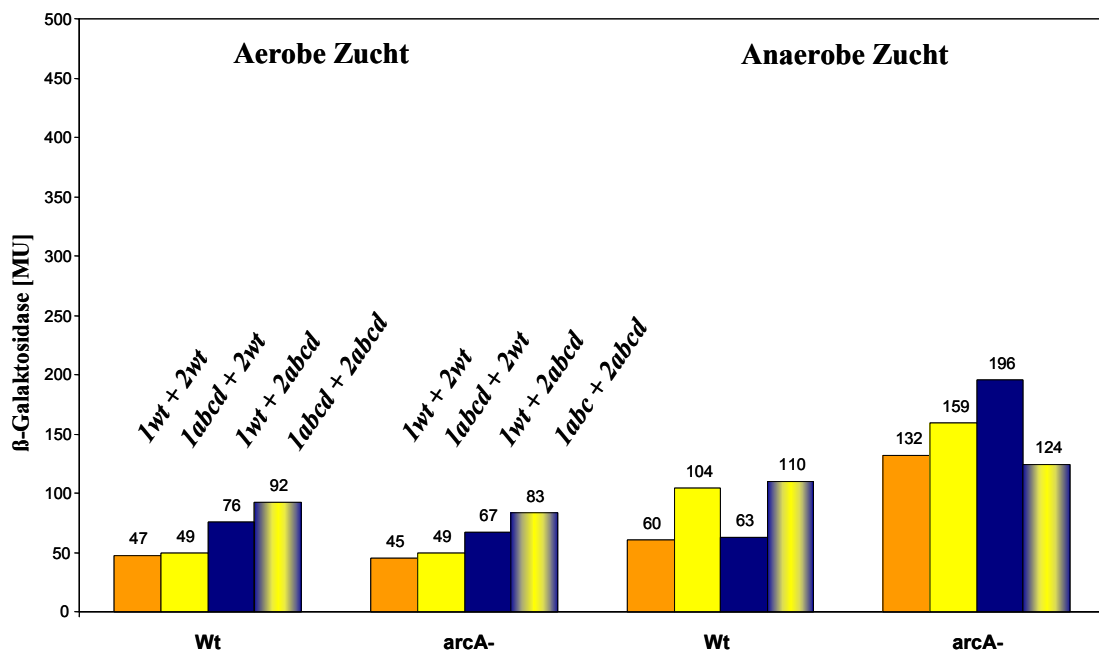


Abb. 25: Expression von P1+P2-lacZ (598 bp) (Wildtyp und *arc1* + *arc2* Mutanten) bei aerober und anaerober Zucht mit Glucose. Gezeigt sind Wildtyp (IMW367, IMW384, IMW349, IMW413) und *arcA*-Mutante (IMW368, IMW359, IMW420, IMW412). Aufgetragen sind die verschiedenen Promotormutanten in *arc1arc2* (orange), *arc1abcd arc2wt* (gelb), *arc1wt arc2abcd* (dunkelblau) und *arc1abcd arc2abcd* (blau mit gelb).

Anhand dieser Messungen lässt sich feststellen, dass unter aeroben Bedingungen Mutationen der ersten Bindestelle *arc1* keinen Einfluss auf die Gesamtexpression von *nuo* haben. Mutationen in der zweiten Bindestelle *arc2* führen zu einer ArcA unabhängigen Expressionssteigerung von P1+P2. Anaerob lässt sich durch Mutation in *arc1* die Repression

durch ArcA stören. Alle weiteren Mutationen verursachen keinen Effekt. Lediglich die *P2arc2_{abcd}* Mutante besitzt im *arcA*-negativen Hintergrund die stärkste Derepression. Diese Ergebnisse bestätigen die Versuche der Gelretardationsuntersuchungen. Durch Mutationen in der Bindestelle *arc1* wird die ArcA abhängige anaerobe Repression um die Hälfte aufgehoben. Mutationen in *arc2* haben keinen Effekt auf die Repression durch ArcA.

Die Expression der P1-*lacZ*-Fusion ist in Abb. 26 dargestellt. Unter aeroben Bedingungen war die Expression von P1 niedrig im Vergleich zur Expression unter anaeroben Bedingungen. Im Wildtyp und in der *arcA*-Mutante führte die schrittweise Inaktivierung der *arc1*-Bindestelle zu einer leichten Zunahme der Expression.

Unter anaerober Zucht erfolgte eine starke Zunahme der Expression von P1 gegenüber der aeroben Zucht. Diese wurde durch die Mutation in *arc1ab* (Faktor 1,6) noch weiter gesteigert. Die vierfache Mutation der Bindestelle in *arc1abcd* führte dagegen zu keiner weiteren Erhöhung der Expression. In der *arcA*-Mutante fand bei anaerober Zucht eine weitere Derepression gegenüber dem Wildtyp statt. Diese wurde aber in den *arc1*-Mutanten (*arc1ab*, *arc1abcd*) nicht weiter gesteigert, so dass die Expression der *arc1ab* und *arc1abcd* Promotormutanten des Wildtyps nicht übertroffen wurde. Diese Aktivitäten zeigen, dass unter anaeroben Bedingungen bereits Mutationen in *arc1ab* ausreichen, um die geringe Repression von P1-*lacZ* durch ArcA aufzuheben.

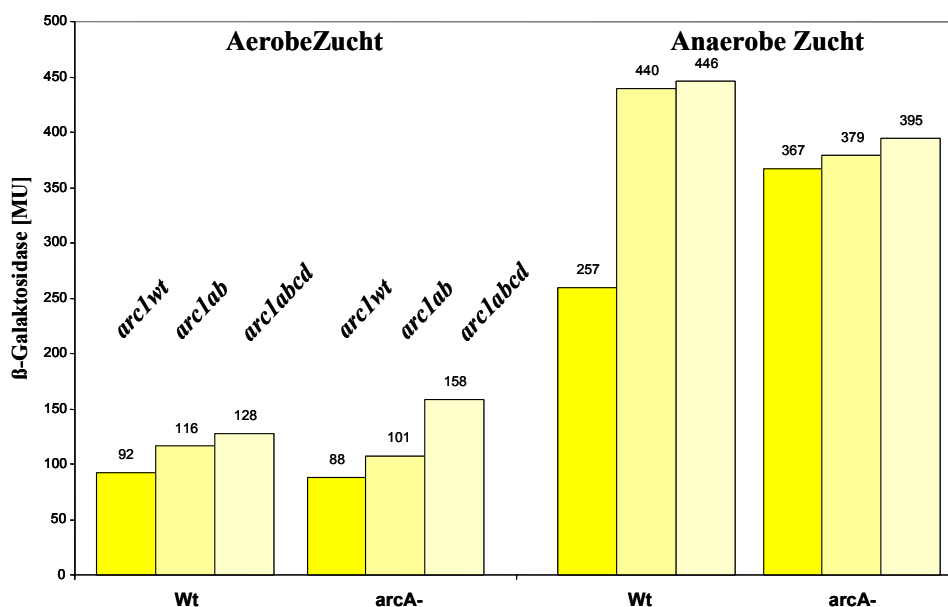


Abb. 26: Expression von P1-*lacZ* (406 bp) (Wildtyp und *arc1*-Mutanten) bei aerober und anaerober Zucht mit Glucose. Gezeigt sind Wildtyp (IMW363, IMW365, IMW382) und *arcA*-Mutante (IMW364, IMW366, IMW421). Aufgetragen sind die verschiedenen Promotormutanten in *arc1* mit *Wt* (dunkelgelb), *ab* (etwas heller gelb) und *abcd* (hellgelb).

Die Expression des P2-Promotors war generell sehr niedrig (Abb. 27). Bei aerober Zucht führte die schrittweise Inaktivierung der *arc2*-Bindestelle in *arc2ab* und *arc2abcd* im Wildtyp und in der *arcA*-Mutante zu einer schrittweisen Verdopplung der Expression, möglicherweise durch eine Derepression.

Bei anaerober Zucht wird die Expression von P2 gegenüber aeroben Verhältnissen reprimiert. Auch unter anaeroben Bedingungen war mit zunehmenden Mutationen der *arc2*-Stelle eine Verdopplung der Expression zu verfolgen. Anders als bei aerober Zucht, fand in der *arcA*-Mutante eine starke Steigerung der Expression gegenüber dem *arcA*⁺-Wildtyp statt (Faktor 6,2). Diese Expression wurde durch Inaktivierung der *arc2* Stelle (*arc2ab* und *arc2abcd*) um den Faktor 1,7 weiter gesteigert. Somit ist der Promotor P2 bei anaerober Zucht deutlich durch ArcA reguliert, aber die Mutation der Bindestelle *arc2* zeigt zusätzlich eine Regulation, die nicht von ArcA abhängt.

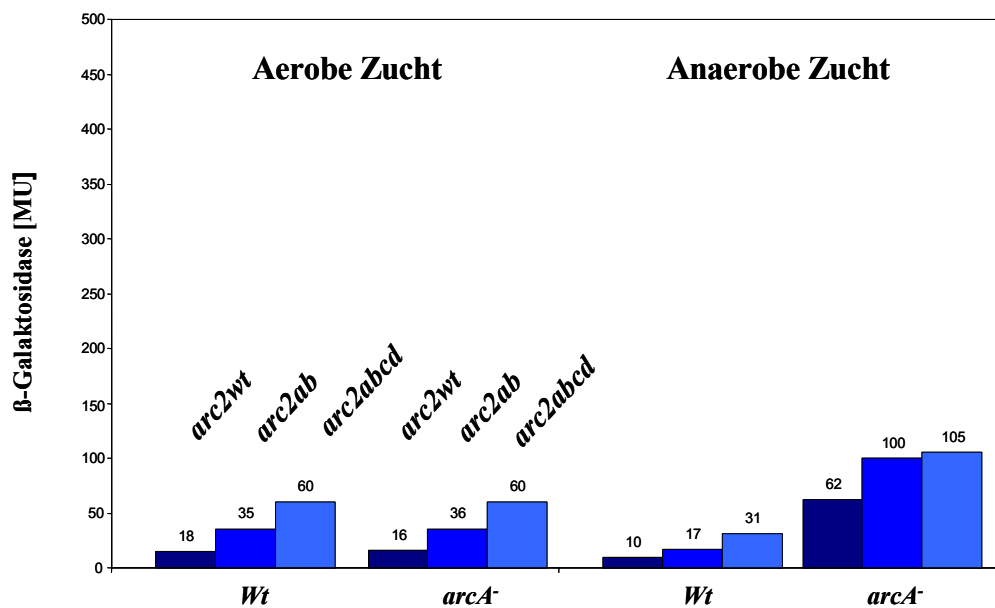


Abb. 27: Expression von P2 (203 bp) (Wildtyp und *arc2*-Mutanten) bei aerober und anaerober Zucht mit Glucose. Gezeigt sind Wildtyp (IMW357, IMW359, IMW361) und *arcA* Mutante (IMW358, IMW360, IMW362). Aufgetragen sind die verschiedenen Promotormutanten in *arc2* mit *Wt* (dunkelblau), *ab* (etwas heller blau) und *abcd* (hellblau).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Promotor P2 unter Anaerobiose durch ArcA reprimiert wird. Die Mutation der Bindestelle *arc2* führt aber sowohl aerob als auch anaerob zu einer ArcA unabhängigen Expressionssteigerung.

4.3.3.2 Translationelle Fusionen

Der Einfluss der Promotormutationen wurde auch in translationellen *lacZ*-Fusionen getestet. Dazu wurden Reporterfusionen hergestellt, in denen der komplette *nuo*-Promotor und ein Teil des codierenden Bereiches von *nuoA'* mit *lacZ* fusioniert waren. In diesen Fusionen lagen die Bindestellen im mutierten oder unmutierten Zustand vor. Die Fusionen wurden mit dem Phagen λ in das Chromosom eines Wildtyps, einer *arcA*-Mutante und einer *ihf*-Mutante integriert. Die Stämme wurden anschließend mit Glucose unter anaeroben und aeroben Bedingungen gezüchtet. Die Regulation wurde über β -Galaktosidaseaktivität gemessen.

Bei aerober Zucht wurde die translationelle Fusion *nuoA'*-*lacZ* im Vergleich zu der transkriptionellen Fusion P1+P2-*lacZ* zweimal stärker exprimiert (Tab. 6 und Abb. 25). Unter diesen Bedingungen hatte der Regulator ArcA keinen Einfluss auf die Expression von *nuo* (Tab. 6). Anaerob erfolgte eine Repression der NADH-Dehydrogenase I (Faktor 1,2). In einer chromosomalen *arcA*-Mutante erfolgte eine Derepression um Faktor 3. Die Inaktivierung von *ihf* führte sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen zu einer minimalen Derepression (Faktor 1,1 bis 1,2). Diese Experimente bestätigen frühere Versuche (Wackwitz, 1999), dass der *nuo*-Promotor nur unter anaeroben Bedingungen stark durch den Regulator ArcA beeinflusst wird. IHF besitzt sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen einen geringen reprimierenden Effekt. Andererseits zeigten sich Expressionsunterschiede der translationellen und transkriptionellen Fusionen beim Umschalten von aeroben zu anaeroben Bedingungen. Während in den translationellen Fusionen die Expression von P1+P2-*lacZ* erhöht wird, erfolgt bei *nuoAB'*-*lacZ* anaerob eine Repression der Expression.

Mit Hilfe der translationellen Fusionen wurde ebenfalls der Einfluss der *arc*-Mutationen auf die Expression untersucht. Unter aeroben Bedingungen hatten nur Mutationen von *arc2* und unter anaeroben Bedingungen nur *arc1*-Mutationen einen Einfluss auf die Expression von *nuo*. Auch in der *ihf*-Mutante hatte nur die Mutation der zweiten Bindestelle einen Effekt auf die Expression von *nuo*.

Bei anaerober Zucht führte nur Mutation in *arc1ab* zur Derepression (Faktor 2). Mutationen der zweiten Bindestelle *arc2* hatten hingegen keinen Einfluss auf die Expressionsstärke. In einer chromosomalen *arcA*-Mutante hatte keine der Mutationen in *arc1* und/oder *arc2* einen Effekt auf die Expression von *nuo*. Mutationen in beiden Bindestellen *arc1* und *arc2* verhielten sich aerob wie Mutationen von *arc2* und anaerob wie Mutation von *arc1*.

Tab. 6 Einfluss von *ihf* und *arcA* auf die Expression von *nuoA'*-*lacZ* (Wildtyp und *arc1/arc2*-Mutanten). Die Zucht erfolgte unter aeroben (O₂) und anaeroben (N₂) Bedingungen in M9-Medium mit Glucose als C-Quelle. Gezeigt sind die Stämme IMW33^(a), IMW286^(b), IMW341^(c), IMW344^(d) (*Wt*), IMW37^(a), IMW288^(b), IMW343^(c), IMW346^(d) (*ihf*), IMW35^(a), IMW287^(b), IMW342^(c), IMW345^(d) (*arcA*).

Stämme (Genotyp)	β-Galaktosidase [MU]					
	<i>Wt</i>		<i>arcA</i> ⁻		<i>ihf</i>	
	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂
<i>nuoA'</i> - <i>lacZ</i> ^(a)	91	75	87	231	115	83
<i>nuoA'</i> - <i>lacZ</i> (<i>1ab</i> + <i>2wt</i>) ^(b)	87	145	92	255	116	156
<i>nuoA'</i> - <i>lacZ</i> (<i>1wt</i> + <i>2abcd</i>) ^(c)	126	73	142	275	151	132
<i>nuoA'</i> - <i>lacZ</i> (<i>1ab</i> + <i>2abcd</i>) ^(d)	146	136	148	273	145	140

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl in translationellen als auch in transkriptionellen Fusionen, nur Mutationen der ersten Bindestelle *arc1*, unter anaeroben Bedingungen, die Repression von ArcA beeinflussen. Mutationen der Bindestelle *arc2* beeinträchtigen die ArcA-Regulation in keiner Weise, führen aber unter aeroben Bedingungen zu einer Derepression. Lediglich in den translationellen Fusionen kann durch Mutation in *arc2* die Repression von IHF unter allen Bedingungen beeinflusst werden. Der Unterschied in der Expressionsstärke zwischen beiden Fusionen kann durch die Ribosomenbindestelle oder die Lage von Promotor-aktiven Bereichen im Strukturgen verursacht werden.

4.3.4 Einfluss der Mutationen von *arc2* auf die Regulation von IHF von Promotor P2

Die Mutationen in der Bindestelle *arc2* führen beim isolierten Promotor P2 zu einer Derepression sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen (Abb. 27). Von *arc2wt* zu *arc2ab* und *arc2abcd* wurde die Expression jeweils um das Doppelte erhöht. Aus früheren Untersuchungen ist bereits bekannt, dass IHF die Expression von *nuo* reprimiert, und die Bindestelle für IHF wurde bereits identifiziert (Wackwitz *et al.*, 1998). Sie überlappt mit der ArcA-Bindestelle *arc2*. Die Mutationen *arc2b* und *arc2c* verändern zusätzlich die Konsensussequenz von IHF und die zugehörige Bindestelle.

Zur Kontrolle, welchen Effekt die Mutationen in den *arc2*-Stellen auf die Funktion von IHF haben, wurde in die *arc2*-Mutanten eine *ihf*-Mutation durch P1-Transduktion eingeführt. Anschließend wurde die β-Galaktosidaseaktivität nach aerober und anaerober Zucht bestimmt

(Tab. 7). Unter aeroben Bedingungen hatte weder die P2-, P2*arc2_{ab}*- noch P2*arc2_{abcd}-lacZ* in der *ihf*, *arcA* oder *arcA ihf*-Doppelmutante einen Effekt in Vergleich zum Wildtyp. Unter anaeroben Bedingungen jedoch ergaben sich bei P2-*lacZ*-Fusionen signifikante Unterschiede: Die Inaktivierung von *arcA* führte in allen Bindestellenmutanten zu einer deutlichen Derepression (Faktor 6 bis 3.2). Auch durch Inaktivierung von *ihf* wurden alle Fusionen dereprimiert (Faktor 1,5 bis 1,8). Ebenso wie in einer chromosomalen *arcA*-Mutante wurde auch in der *ihf* und *arcA ihf*-Doppelmutante die Expressionshöhe mit zunehmender Mutation der Bindestellen *arc2* gesteigert. Lediglich die Expression von P2*arc2_{abcd}-lacZ* im *arcA*-negativen Hintergrund wurde gegenüber P2*arc2_{ab}-lacZ* nicht weiter gesteigert.

Tab. 7: Einfluss von *ihf* und *arcA* auf die Expression von P2-*lacZ* (Wildtyp und *arc2*-Mutanten). Die Zucht erfolgte unter aeroben (O₂) und anaeroben (N₂) Bedingungen in M9-Medium mit Glucose als C-Quelle. Gezeigt sind die Stämme IMW357^(a), IMW359^(b), IMW361^(c) (*Wt*), IMW401^(a), IMW402^(b), IMW403 (*ihf*), IMW358^(a), IMW360^(b), IMW362^(c) (*arcA*), IMW404^(a), IMW405^(b), IMW406^(c) (*ihf*, *arcA*).

Stämme (Genotyp)	β-Galaktosidase [MU]					
	P2- <i>lacZ</i> ^(a)		P2 <i>arc2_{ab}-lacZ</i> ^(b)		P2 <i>arc2_{abcd}-lacZ</i> ^(c)	
	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂
<i>Wt</i>	18	10	36	17	58	32
<i>ihf</i>	18	15	28	31	42	49
<i>arcA</i> ⁻	17	62	36	100	60	105
<i>arcA</i> ⁻ <i>ihf</i> ⁻	17	40	26	48	43	63

Zusammenfassend kann man sagen, dass trotz Ausschaltens von *arcA* und/oder *ihf* die Verdopplung der Expression bei zunehmender Mutationszahl nicht aufgehoben wird. Diese Ergebnisse belegen, dass die Mutagenese der Bindestelle *arc2* keinen Einfluss auf die von P2 aus gesteuerte Genexpression durch ArcA und IHF nimmt.

4.4 *In vitro* Transkription der *nuo*-Promotoren

Die Regulation der NADH-Dehydrogenase I setzt sich aus einem komplexen Netzwerk verschiedener Umweltfaktoren und Regulatoren zusammen. Wie in der Abb. 2 dargestellt, überlappen sich Bindestellen und Kontrollelemente im Bereich der intergenischen Region. Daher ist es experimentell kaum möglich, den Einfluss von ArcA-P mittels der

Promotormutationen in den ArcA-P-Bindestellen auf die Expression von *nuo* zu untersuchen, ohne dass weitere Regulatoren oder regulatorische Elemente die Expression beeinflussen.

Mit Hilfe der *in vitro* Transkription kann man die Funktion oder Beteiligung von Transkriptionsfaktoren, transkriptionellen Aktivatoren oder Repressoren untersuchen (Tan et al., 1996). Dabei können die einzelnen Faktoren getrennt und in definierter Form eingesetzt werden. Dies ermöglicht die getrennte Untersuchung eines Regulators. In vorhergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass auf dem *nuo*-Promotor zwei Haupttranskripte mit den Transkriptionsstartpunkten T1 (-173) und T2 (+6) abgelesen werden.

Um die Regulation der NADH-Dehydrogenase I besser zu verstehen, wurden mit dem gesamten *nuo*-Promotor (P1+P2), mit Promotor P1 und Promotor P2 *in vitro* Transkriptionsexperimente durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war, zu klären, welche Regulatoren die Expression der einzelnen Transkripte beeinflussen.

Für eine *in vitro* Transkription benötigt man ein geeignetes Plasmid mit dem Promotor, der untersucht werden soll. Auf diesem Plasmid muss in definiertem Abstand zum Transkriptionsstartpunkt ein Terminator lokalisiert sein. Wird das Plasmid mit dem Holoenzym der RNA-Polymerase und den Nucleotiden inkubiert, entsteht eine RNA definierter Größe, die durch den Einbau von radioaktiven Nucleotiden anschließend auf einem Sequenziergel detektiert werden kann.

Für die Untersuchungen wurden beide Promotoren separat oder gemeinsam in einen „G-less“-Vektor pMT504 (Tan et al., 1996) kloniert (Abb. 28). Bei diesem Vektor wird in die Klonierungsstelle der Promotor kloniert, dessen Transkription untersucht werden soll.

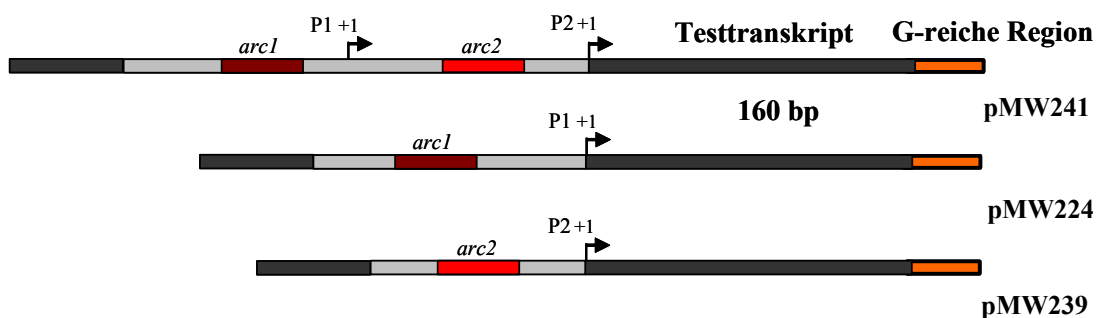


Abb. 28: Konstrukte für die *in vitro* Transkription. Gezeigt sind die Fragmente der *nuo*-Promotors (hellgrau), die in den Vektor pMT504 (dunkelgrau) vor dem Testtranskript und der G-reichen Region (orange) kloniert sind.

Unterhalb der Klonierungsstelle trägt der Vektor hinter dem Transkriptionsstartpunkt eine DNA-Kassette, die kein Guanin (G) enthält. Hinter dieser Kassette befindet sich eine G-reiche Region. Wird mit diesem Konstrukt eine Transkription *in vitro* in Anwesenheit von o-Methyl-

GTP durchgeführt, so terminiert die Reaktion immer an derselben Stelle bei Beginn der G-reichen Region, da mit o-Methyl-GTP keine mRNA polymerisiert werden kann. Dadurch erhält man ein Transkript definierter Größe (160 bp). Das Plasmid enthält zusätzlich zur Kontrolle einen schwachen *E. coli* Promotor mit einer G-less Kasette. Das Produkt dieser Transkription ist 130 bp groß und somit eindeutig vom eigentlichen Transkript zu unterscheiden.

Zunächst wurde die Funktion der Promotoren P1, P2 und P1+P2 *in vitro* getestet. Dazu wurden die drei Plasmide mit den klonierten Promotoren und das Kontrollplasmid mit dem schwachen *E. coli* Promotor in eine Transkriptionsreaktion in zwei Ansätzen ohne und mit 1 μ M ArcA-P, eingesetzt. Bei allen Plasmiden war ein Transkript bei 130 bp zu erkennen (Abb. 29). Daraus kann man schließen, dass die Transkriptionsreaktion funktioniert. Auch in Anwesenheit von ArcA-P war das Kontrolltranskript von 130 bp zu erkennen. Zusätzlich zu dieser Bande tauchte in allen Proben eine weitere Bande bei ca. 160 bp auf, bei der es sich um das Testtranskript handeln muss. Diese Bande war deutlich schwächer als das Kontrolltranskript. Diese Bande war in allen Ansätzen zu erkennen und war in Anwesenheit von ArcA-P in ihrem Gehalt nicht verändert.

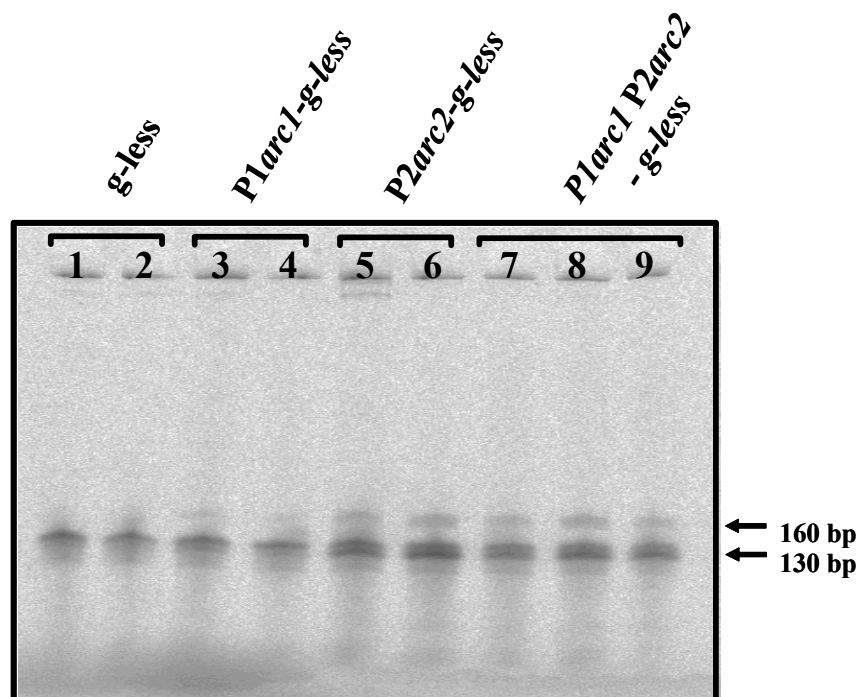


Abb. 29: In vitro Transkription des *nuo*-Promotors. Dargestellt sind die einzelnen Transkripte vom pMT504 (Bahn 1 und 2), des Promotors P1 (Bahn 3 und 4), des Promotors P2 (Bahn 5 und 6), sowie des kompletten Promotors (Bahn 7, 8 und 9) jeweils ohne (Bahn 3,5 und 7) und mit 1 μ M ArcA-P (Bahn 4,6 und 8).

Auch in dem Konstrukt mit dem kompletten Promotor war nur das Transkript (T2) des Promotors P2 sichtbar, nicht aber das Transkript (T1) von Promotor P1, für das eine Länge von 338 bp erwartet wird. Dieses Transkript (T1) enthält vom Startpunkt T1 bis zum Beginn des G-freien Testtranskripts zahlreiche G-Basen und kann damit in Anwesenheit von o-Methyl-GTP nicht synthetisiert werden. Dies erklärt das Fehlen dieses Transkriptes. Die Stärke der Promotoren ist allerdings gemessen an der Menge der gebildeten Transkripte sehr gering verglichen mit der Menge an Kontrollpromotor, so dass nicht auszuschließen ist, dass notwendige Regulatoren für eine optimale Transkription fehlten.

4.5 Glucoserepression von *nuo*

Frühere Versuche haben gezeigt, dass die Expression der *nuoA-N* Gene bei Zucht auf Glucose reprimiert wird (Bongaerts et al., 1995). Für die Steuerung der Glucoseaufnahme und Vewertung in *E. coli* sind verschiedene Regulatoren bekannt. Neben cAMP/CRP und Cra (catabolite repressor-aktivator-protein) sind dies Mlc und NagC. Letztere beiden Proteine sind erst seit kurzem als Regulatoren des Zuckerstoffwechsels von *E. coli* (Kiamata et al., 1998; Plumbridge, 2001) bekannt. Im intergenischen Bereich vor den NADH-Dehydrogenase I-Genen befinden sich zwei palindromische Sequenzen (Abb. 30), die große Ähnlichkeit zu den Erkennungssequenzen der Genregulatoren Mlc und NagC aufweisen (Abb. 6). Um eine Beteiligung von Mlc oder NagC an der Glucoserepression zu untersuchen, wurden *nuoA'*-*'lacZ* Reporterfusionen verwendet. In den Reporterengestamm wurde das *mlc*- bzw. das *nagC*-Gen durch P1-Transduktion gegen eine inaktive Form des entsprechenden Gens ausgetauscht. Dabei waren beiden Gene jeweils durch Insertion einer Resistenzkassette markiert und inaktiviert worden.

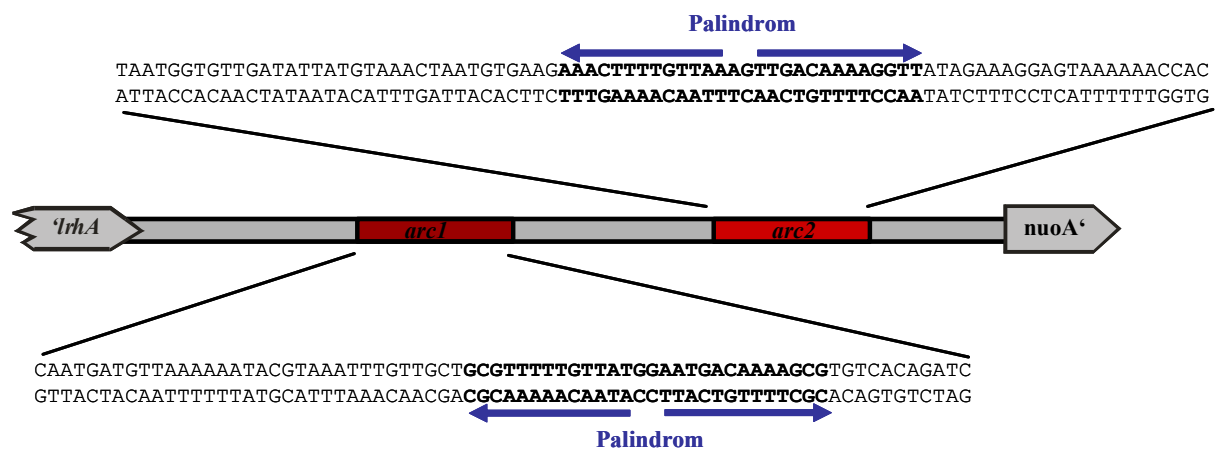


Abb. 30: Palindrome innerhalb der beiden ArcA-Bindestellen *arc1* und *arc2*. Gezeigt ist der intergenische Bereich von *nuo* mit den beiden ArcA-Bindestellen (rot) und den beiden Palindrome (blaue Pfeile)

In Anwesenheit von Glucose war die Expression der *nuoA'*-*lacZ*-Fusion, wegen der Glucoserepression, gegenüber dem Wachstum mit Glycerin um Faktor 2,4 reprimiert (Tab. 8). Sowohl in der *mlc*- als auch in der *nagC*-Mutante war keine Aufhebung der Glucoserepression zu beobachten. Die Werte waren vergleichbar mit denen des Wildtyps. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass weder das Mlc, noch das NagC-Protein für die Glucoserepression von *nuo* verantwortlich sind.

Die CRP/cAMP abhängige Glucoseregulation wird durch die intrazellulären cAMP-Gehalte reguliert (Kimata et al., 1998; Plumbridge, 1999). Bei fehlendem Angebot an Glucose steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel. Zusammen mit dem CRP (cAMP receptor protein) aktiviert cAMP die Transkription der Gene, deren Genprodukte am Abbau alternativer C-Quellen beteiligt sind. Niedrige intrazelluläre cAMP-Gehalte können durch Zusatz hoher Konzentrationen extrazellulären cAMPs kompensiert werden (Kimata et al., 1998; Plumbridge, 1999). Zugabe von externem cAMP (5mM) zum Medium bei aerober Zucht mit Glucose führte zu einer minimalen Expressionssteigerung (Faktor 1,3) von *nuoA'*-*lacZ* im Wildtyp. Auch in der Mlc-Mutante konnte diese Steigerung der Expression bei Zugabe von cAMP beobachtet werden. Wachstum des Wildtyps und der Mlc-Mutante in Gegenwart von Glycerin und cAMP führte zu keiner veränderten Expression gegenüber der Zucht mit Glycerin alleine (Tab. 8).

Tab. 8: Einfluss von Mutationen in *mlc*, *nagC* und *cya* auf die Expression von *nuoA'*-*lacZ*.

Die Zucht erfolgte unter aeroben Bedingungen im M9-Medium mit Glucose oder Glycerin als C-Quelle mit und ohne Zusatz von externem cAMP (5 mM).

Zucht	Expression of <i>nuoA'</i> - <i>lacZ</i> [MU]			
	IMW33 (Wt)	IMW378 (<i>mlc</i> ⁻)	IMW407 (<i>nagC</i> ⁻)	IMW62 (Δ <i>cya</i>)
Glucose + O ₂	86	82	73	95
Glycerin + O ₂	206	193	203	202
Glucose + O ₂ + cAMP	110	118	nd	107
Glycerin + O ₂ +cAMP	196	193	nd	208

Die mögliche Beteiligung von CRP an der Glucoserepression wurde außerdem anhand von *nuoA*'-'*lacZ* Reporterfusionen untersucht. Hierzu wurden Mutanten verwendet, denen das *cya*-Gen deletiert wurde, welches für die Adenylatcyclase kodiert. Ohne dieses Enzym sind die Zellen nicht mehr in der Lage, cAMP als Hungersignal zu bilden. Wenn die Expression von *nuo* durch cAMP/CRP reguliert ist, so sollte dessen Expression bei Zucht mit Glycerin in solch einer Mutante den gleichen Wert haben wie der Wildtyp mit Glucose. Externe Zugabe von cAMP sollte die Expression wieder erhöhen.

Die Zucht der *cya*-Mutante mit Glycerin und Glucose führte zu keiner veränderten Expression gegenüber dem Wildtyp. Auch bei externer cAMP Zugabe verhielt sich die Mutante mit Glucose und Glycerin wie der Wildtyp (Tab. 8).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Glucoserepression von *nuo* weder durch CRP noch durch Mlc oder NagC vermittelt wird. Die minimale Erhöhung der Expression mit externem cAMP ist vermutlich auf einen indirekten Effekt zurückzuführen.

4.6 NarL abhängige Transkriptionskontrolle von *nuo*

4.6.1 Isolierung von NarL

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Expression des *nuo*-Operons in der anaeroben Nitratrespiration durch das Zweikomponentensystem NarX/L aktiviert wird (Bongaerts et al., 1995). Aus Genfusionsstudien war bekannt, dass bei einer teilweisen Deletion des *nuo*-Promotors oberhalb der Position -277 die NarL abhängige Aktivierung ausfiel und bei weiterer Deletion keine Nitratinduktion mehr auftrat (Bongaerts et al., 1995). Aus diesem Grund war anzunehmen, dass der Nitratregulator NarL unmittelbar stromab von Position -277 mit der *nuo*-Promotor-DNA interagiert. Um die Bindestelle des NarL-Proteins am intergenischen Bereich vor *nuoA* zu lokalisieren, wurden Gelretardations- und DNaseI Footprint-Versuche mit dem NarL-Protein durchgeführt.

Zur Überproduktion von NarL wurde das Expressionsplasmid pMW150 konstruiert, über das das NarL-Proteins als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His₆-Anhang, gebildet wird.

Nach Induktion wurde ein Protein mit einer molekularen Masse von 24 kDa überproduziert, das der erwarteten Größe von NarL entsprach (Abb. 31). Nach Zellaufschluss und Zentrifugation befand sich das Protein im löslichen Überstand des Zellhomogenats. Das Protein wurde durch Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-Chelat-Säule gereinigt. Das überproduzierte Protein band an die Ni²⁺-Chelat-Säule und wurde mit Imidazol spezifisch von der Säule eluiert. Im SDS-Gel des gereinigten Proteins waren neben dem NarL-Protein nur geringe Verunreinigungen durch andere Proteine zu sehen (Abb. 31).

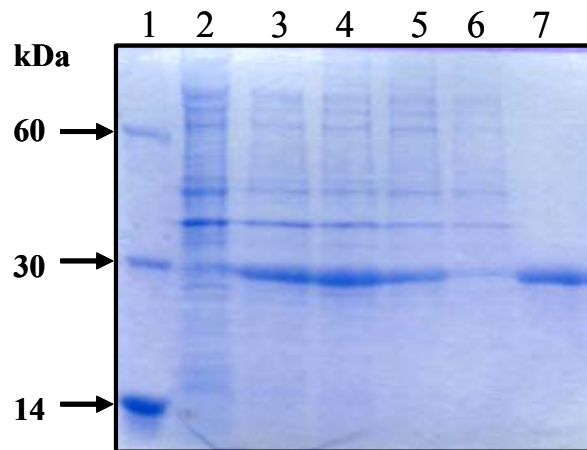


Abb. 31: Überproduktion und Reinigung von NarL aus *E. coli* BL21DE3 (pMW150). Die Proteine wurden durch SDS PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Spur 1: Standard, Gemisch aus BSA (M_r 60 000), Carboanhydrase, (M_r 30 000) und Lysozym, (M_r 14 500)
 2: 10 µg Protein
 3: 20 µg Protein nach 2h Induktion mit IPTG
 4: Zellhomogenat, 30 µg Protein
 5: Lösliche Fraktion, 20µg Protein
 6: Eluat (500mM Imidazol) nach Ni-NTA-Agarose –Säule
 7: isoliertes NarL-Fusionsprotein, 15 µg Protein

Die Phosphorylierung von His₆-NarL sollte durch Inkubation des Proteins mit Acetyl-P erreicht werden. Die Phosphorylierung von His₆-NarL und NarL wurde mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) überprüft (Abb. 32). Dazu wurde gereinigtes His₆-NarL und NarL mit Acetyl-P für 1 h bei RT inkubiert und anschließend mit isoelektrischer Fokussierung getrennt. In einem horizontalen IEF Gel läuft die Bande von His₆-NarL bei einem isoelektrischen Punkt (pI) von ungefähr 6.3. Die Bande von His₆-NarL-P hat einen veränderten pI-Wert von 6,2. Für NarL bzw. NarL-P (nach Abspaltung des His-Anhangs) ergeben sich gleiche Verhältnisse, nur mit dem Unterschied, dass NarL einen pI-Wert von ca. 5,66 hat. Mit der in vitro Phosphorylierung konnten 30-40 % des inkubierten His₆-NarL phosphoryliert werden (Abb. 32). Um ein Anhang-freies Protein zu erhalten erfolgte die Abspaltung des His₆-Anhangs mit Thrombin. Die Ausbeuten schwankten dabei zwischen 50-100 %.



Abb. 32: Isoliertes, unphosphoryliertes und phosphoryliertes NarL und His₆-NarL. Auftrennung in horizontaler IEF und Anfärbung mit SERVA Violett 17. Aufgetragen sind je 0,1 µg Protein/Bahn: NarL-P (Spur 1), NarL (Spur 2), His₆-NarL-P (Spur 3) und His₆-NarL (Spur 4).

4.6.2 Spezifische Bindung von NarL an den *nuo*-Promotor

Die genaue Lage der Bindestelle von NarL war bisher nicht bekannt. Zur Untersuchung der spezifischen Bindung von NarL an den *nuo*-Promotor und der Lage der Bindestelle wurden NarL und His₆-NarL für Gelretardations- und DNaseI Footprint Versuche eingesetzt. In zahlreichen Versuchen konnte weder von His₆-NarL-P noch von NarL-P in Gelretardationsexperimenten eine Bindung an den radioaktiv markierten *nuo*-Promotor (P1+P2) festgestellt werden.

Zum Test, ob die Bindung des NarL-P einen Schutz gegenüber DNaseI-Verdau verursacht, wurden DNaseI Footprintversuche mit NarL-P durchgeführt. Dazu wurde der radioaktiv markierte *nuo*-Promotor (Abb. 15b) mit steigenden Konzentrationen an phosphoryliertem His₆-NarL inkubiert und mit DNaseI behandelt (Abb. 33). Im Bereich von -283 bis -318 wurde ein schwacher Schutz vor DNaseI-Verdau durch His₆-NarL-P beobachtet. Innerhalb der Bindestelle von NarL liegt eine NarL-Konsensussequenz. Sie besteht aus dem Heptamer T-A-C-C/T-C/T-A/C-T. Diese Sequenz von *nuo* stimmt in 5 von 7 Basen mit der Konsensussequenz überein und befindet sich bei Position -263 auf dem codierenden Strang und überlappt mit dem 3' Bereich der *arc1* Bindestelle.

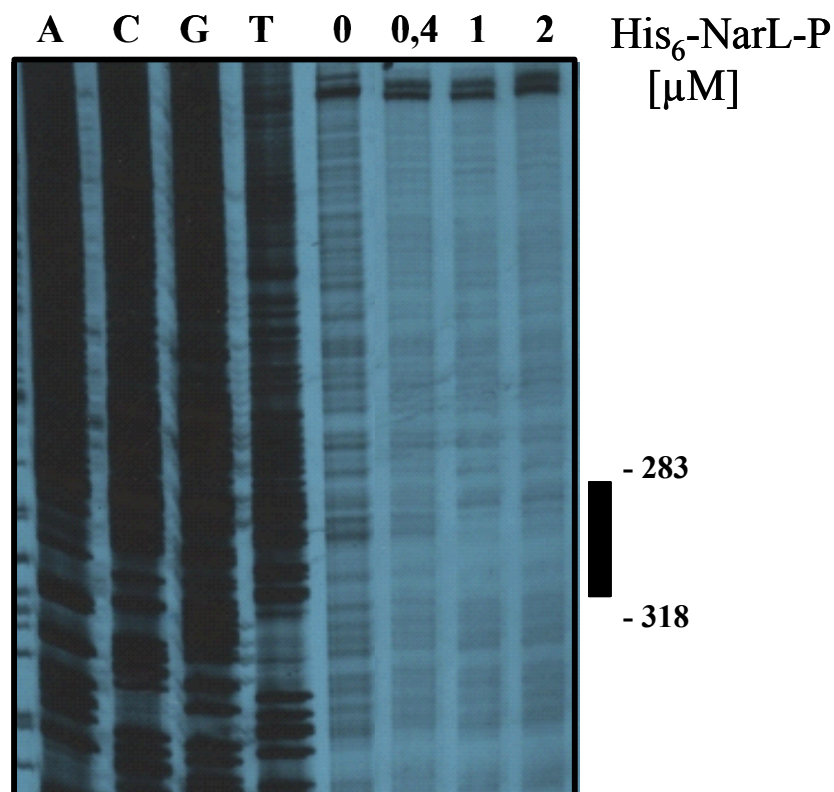


Abb. 33: DNaseI Footprint der NarL Bindung an den intergenischen Bereich vor *nuoA*. Die am codierenden Strang markierte *nuo*-Promotor-DNA (560 bp) (P1+P2) wurde mit steigenden Konzentrationen an NarL-P inkubiert und mit DNaseI verdaut. Die geschützte Region ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Die Nummerierung wurde nach Weidner et al. (1993) vorgenommen. Als Standard (A, C, G und T) wurde ein nach Sanger et al., 1977 sequenziertes Fragments benutzt.

Die Region stimmt mit dem Bereich überein, der aus früheren Promotordeletionsstudien vorgeschlagen wurde (Bongaerts *et al.*, 1995).

Eine Bindung von NarL-P an weitere DNA-Abschnitte wurde nicht gefunden, obwohl im Bereich des intergenischen Bereichs vor *nuoA* weitere potentielle Konsensussequenzen für NarL vorhanden sind.

4.6.3 Expressionskontrolle des *nuo*-Promotors durch Nitrat

Frühere Studien hatten gezeigt, dass NarL unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von NO_3^- die Expression von *nuoA-N* aktiviert (Bongaerts *et al.*, 1995). Die eng benachbarte Lage der Bindestellen von ArcA und NarL bei -277 und -263, sowie die Vermutung, dass sich bei Zucht auf Nitrat in einer chromosomalen *arcA*-Mutante der Nitrat-Effekt und die anaerobe Derepression addieren (Bongaerts, 1996), führten zu der Frage, ob es eine Wechselwirkung zwischen NarL und ArcA gibt.

Zur Untersuchung der Expressionskontrolle durch Nitrat wurden die translationellen Reporterfusionen *nuoA'-lacZ* verwendet. Neben der bereits vorhandenen *arcA* Mutante wurde mit Hilfe des λ Phagen eine *narL* und eine *arcA narL* Doppelmutante konstruiert. Auch der Einfluss der Promotormutationen auf die von NarL vermittelte Aktivierung sollte untersucht werden. Die beiden ArcA-Bindestellen waren in verschiedenen Kombinationen mutiert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde unter anaeroben Bedingungen mit Glucose und Nitrat gemessen (Tab. 9).

Nitrat verursachte bei Wachstum auf Glucose eine Erhöhung der Expression von *nuoA'-lacZ* um den Faktor 1,6 gegenüber Glucose (Tab. 9). In einer *narL* Mutante war die Expression um Faktor 1,3 niedriger als im Wildtyp. Im *arcA*-negativen Hintergrund erfolgte eine Derepression um Faktor 1,6 gegenüber dem Wildtyp. In der *narL arcA*-Doppelmutante war die Expression um Faktor 2,1 höher als im Wildtyp. Mutationen in *arc1ab* und/oder *arc2ab* führten zu einer Derepression (Faktor 1,3 bzw. 1,7) der Expression von *nuoA'-lacZ*. In diesen Promotormutanten hatte die Inaktivierung von *narL* keine Einfluss mehr auf die Höhe der Expression von *nuo*. In der *arcA*-Mutante lagen die Werte deutlich höher als im Wildtyp. In allen Promotormutanten waren die Expressionswerte der *narL arcA*-Doppelmutanten in ähnlicher Weise erhöht wie der Wildtyp-Promotor in der Doppelmutante.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei anaerober Zucht auf Glucose mit Nitrat Mutationen in *arc1ab* sowie *arc2ab* die NarL-abhängige Expression beeinflussen. Folglich scheinen die beiden Regulatoren NarL und ArcA unter anaeroben Bedingungen mit Glucose und Nitrat gemeinsam die Expression der NADH Dehydrogenase I zu vermitteln. Es ist aber

nicht klar, ob hierfür eine Interaktion der beiden Regulatoren oder die räumliche Nähe der ArcA- (*arc1*) und NarL-Bindestelle auf der DNA verantwortlich ist.

Tab. 9: Einfluss von *narL* und *arcA* auf die Expression von *nuoA'*-*lacZ* bei anaerober Zucht mit Nitrat
Die Zucht erfolgte anaerob in M9-Medium mit Glucose plus Nitrat.

Stämme (Genotyp)	β-Galaktosidaseaktivität [MU]			
	<i>wt</i> ¹	<i>arc1_{ab}</i> ²	<i>arc2_{ab}</i> ³	<i>arc1_{ab}arc2_{ab}</i> ⁴
<i>Wt</i>	122	164	203	182
<i>narL</i> ⁻	96	162	211	211
<i>arcA</i> ⁻	201	243	234	257
<i>arcA</i> ⁻ , <i>narL</i> ⁻	261	252	258	257

¹ *nuoA'*-*lacZ* (IMW33, IMW36, IMW35, IMW311)

² (*arc1_{ab}*+*arc2*) *nuoA'*-*lacZ* (IMW286, IMW296, IMW287, IMW300)

³ (*arc1*+*arc2_{ab}*) *nuoA'*-*lacZ* (IMW303, IMW312, IMW304, IMW301)

⁴ (*arc1_{ab}*+*arc2_{ab}*) *nuoA'*-*lacZ* (IMW307, IMW312, IMW308, IMW302)

Letztlich wurde die NarL-abhängige Aktivierung der Expression von *nuoA'*-*lacZ* während der Wachstumsphase im Wildtyp und in einer *narL*-Mutante getestet (Abb. 34). Zum Vergleich wurde die Expression von (*arc1_{ab}*+*arc2*) *nuoA'*-*lacZ* im Wildtyp und in der *narL*-Mutante untersucht, da durch diese Mutationen die Aktivierung von *nuo* durch NarL aufgehoben wird. Beim Wachstum von *nuoA'*-*lacZ* waren zwei Maxima der Expression zu erkennen (Abb. 34a) (Bongaerts *et al.*, 1995; Wackwitz *et al.*, 1998). Ab einer OD_{578nm} von 0,6 war eine Aktivierung durch NarL in den Wachstumskurven der *narL*-Mutante gegenüber dem Wildtyp zu erkennen. Der größte Unterschied zwischen den beiden Wachstumskurven war jeweils nach den beiden Maxima zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigt das Wachstum von (*arc1_{ab}*+*arc2_{wt}*) *nuoA'*-*lacZ* im Wildtyp und der *narL*-Mutante keine signifikanten Unterschiede. Zusammenfassend kann man sagen, dass es eine NarL abhängige Aktivierung der Expression von *nuo* gibt, die während der gesamten Wachstumsphase bestehen bleibt. Mutation der ersten ArcA-Bindestelle (*arc1_{ab}*) führt zum fast vollständigen Verlust dieser Aktivierung.

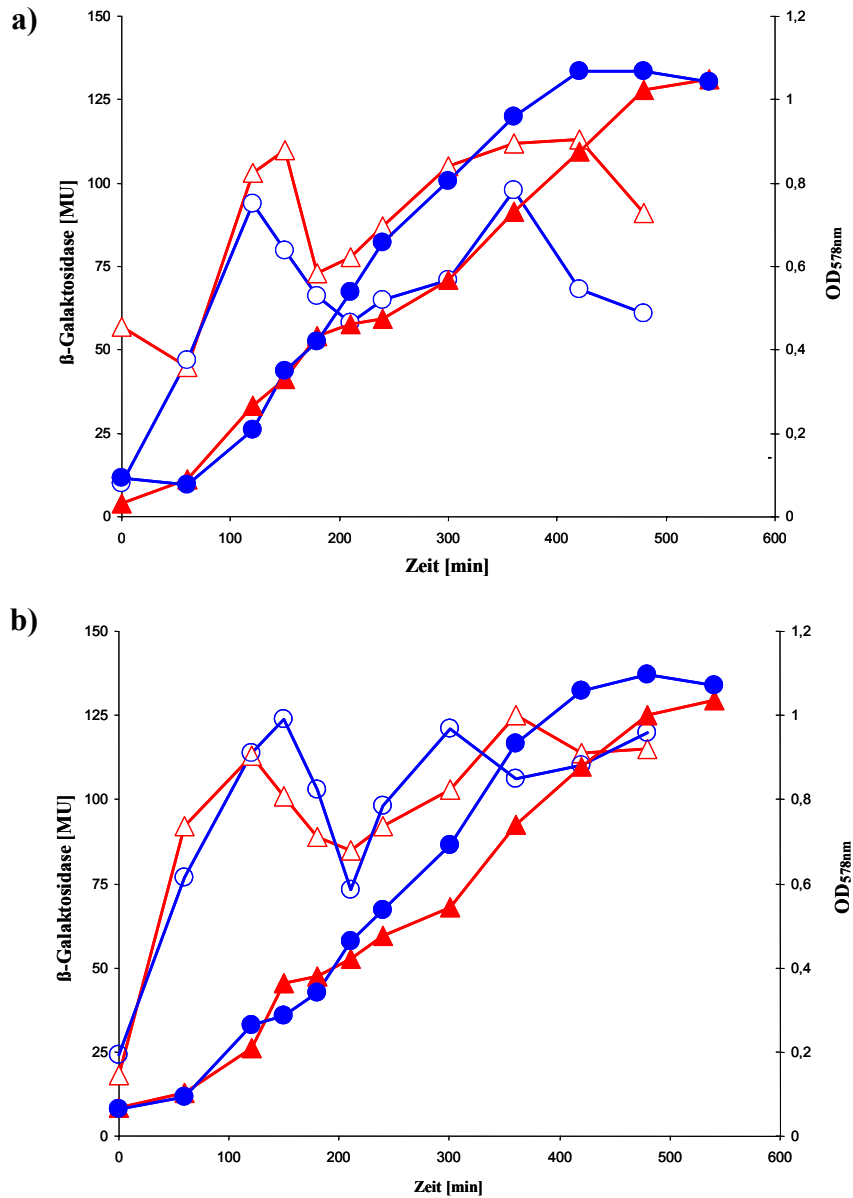


Abb. 34: Wachstumsphasen in Abhängigkeit der Expression von *nuoA'-lacZ* (a) und *(arc1ab + arc2w)*, *nuoAB'-lacZ* (b) während der Nitratatmung. Gezeigt sind Wildtyp (IMW33 bzw. IMW286, Dreiecke) und *narL* Mutante (IMW36 bzw. IMW296, Kreise). Geschlossene Symbole zeigen das Wachstum an, offene die Expression. Die Zucht erfolgt anaerob in M9-Medium mit Glucose als C-Quelle und Nitrat.

5. Diskussion

5.1 Architektur des regulatorischen Bereichs vor *nuo*

Die Expression der Gene der NADH-Dehydrogenase I (*nuoA-N*) erfolgt von zwei Promotoren, P1 und P2 (Abb. 35). Viele bakterielle Gene besitzen mehrere Promotoren (Nasser *et al.*, 2002; Opel *et al.*, 2001) und werden von diesen exprimiert. Ein Teil der σ^{70} -regulierten Gene besitzt neben mehreren Promotoren verschiedene Regulatoren (Collado-Vides *et al.*, 1991). Die Notwendigkeit eines regulatorischen Bereichs mit mehreren Promotoren ist nicht immer klar. So wird die Expression von *cydAB* durch 5 Promotoren (Govantes *et al.*, 2000a; Govantes *et al.*, 2000b), *focA-pfl* durch 7 Promotoren (Drapal und Sawers, 1995), *dadA* durch 3 Promotoren und *rrnB* durch 2 Promotoren (Zhang und Bremer, 1996) reguliert.

Sind mehrere Promotoren vorhanden, so können diese auf unterschiedlichem Weg miteinander wechselwirken. Dabei spielt die räumliche Lage der Promotoren zueinander eine wichtige Rolle. Liegen die Promotoren entgegengesetzt und überlappen sich dabei, können sie sich gegenseitig stören (Aiba, 1983; Hanamura und Aiba, 1991). Liegen zwei oder mehrere Promotoren in gleicher Richtung, so spricht man von Tandempromotoren. Auch hierbei ist eine gegenseitige physische Hemmung denkbar. So kann die starke Aktivität des stromaufwärts liegenden Promotors die Initiation des zweiten schwächeren Promotors verhindern und ihn damit blockieren. Man spricht hierbei von sterischer Behinderung der Promotoren (Adhya und Gottesman, 1982; Zhang und Bremer, 1996; Goodrich und McClure, 1991, Nasser *et al.*, 2002). Neben der physischen Hemmung der Promotoren kann die Regulation auch über eine spezifische Protein-Protein-Wechselwirkung erfolgen.

Die Promotoren der NADH-Dehydrogenase I sind in einem Tandempromotor angeordnet. Die entsprechenden Transkriptionsstartpunkte befinden sich an Position -172/-173 (P1) und Position +6 (P2). In Expressionsmessungen der *lacZ*-Fusionen sind die getrennten Promotoren P1 und P2 beide aktiv. Allerdings ist ihre Expressionsstärke *in vivo* sehr unterschiedlich. Promotor P1 zeigt unter aeroben Bedingungen eine starke Expression, die unter anaeroben Bedingungen noch weiter gesteigert wird. Dagegen erfolgt von Promotor P2 unter allen Bedingungen eine sehr schwache Expression. Knaus und Bujard entwickelten 1988 eine Formel für die Messung der Expressionsstärke. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings eine andere Meßmethode angewendet, daher wird die Expression als relative Stärke bezeichnet.

Die Expressionsstärke des Gesamtpromotors von *nuo* (P1+P2) ist niedriger als die Summe beider Promotoren und sogar kleiner als die Expression von P1 alleine. Somit kann

ausgeschlossen werden, dass die Expressionsstärke beider Promotoren additiv ist. Eine mögliche Ursache liegt im Aufbau der Fusionen. Während bei P1+P2-*lacZ* und P2-*lacZ* der Anteil des fusionierten Proteins identisch ist, liegt bei P1-*lacZ* eine um 15 bp kürzere Fusion vor. Bei der Transkription beider Promotoren muss eine gegenseitige Beeinflussung über eine sterische Hemmung oder eine spezifische Regulation erfolgen.

Für die spezifische Regulation von Promotoren sind häufig verschiedene Strukturelemente und Regulatoren notwendig (Tsung *et al.*, 1990). In *E. coli* sind 314 regulatorische DNA-Bindeproteine bekannt. Davon sind 35 % Aktivatoren, 43 % Repressoren und 22 % der Bindeproteine können sowohl als Aktivator, als auch als Repressor fungieren (Perez-Rueda *et al.*, 2000). Von den 20 bei Prokaryoten bekannten Klassen von Helix-Turn-Helix Bindeproteinen sind alle Familien in *E. coli* vertreten. Die Wirkungsweise eines Promotors ist von dessen regulatorischem Bereich abhängig.

Im intergenischen Bereich vor dem *nuo*-Operon befinden sich mehrere Bindestellen für Regulatoren. Promotoren mit mehr als einem Kontrollelement sind sehr kompliziert, da die vorhandenen Bindestellen überlappen können (Collado *et al.*, 1991). Für den anaeroben Regulator ArcA befinden sich zwei Bindestellen (*arc1* und *arc2*), stromauf der beiden Promotoren P1 und P2 (Abb. 35). Innerhalb der ersten ArcA-Bindestelle *arc1* befindet sich eine weitere Regulatorbindestelle für das Fis-Protein, die Bindestelle *fis3*. Neben der *fis3*-Bindestelle befinden sich stromauf noch zwei weitere Fis-Bindestellen *fis1* und *fis2*. In der *arc2*-Bindestelle ist eine Bindestelle für IHF lokalisiert, *ihf*. Neben diesen bereits bekannten Bindestellen ist in dieser Arbeit eine Bindestelle des Nitratregulators NarL, direkt stromab der Bindestelle *arc1* identifiziert worden

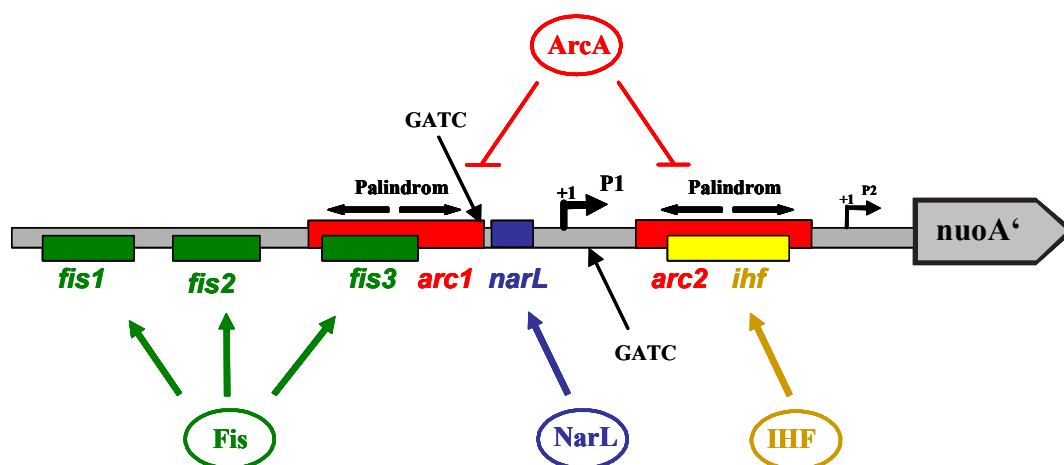


Abb. 35: Aufbau der regulatorischen Region vor *nuoA*. Gezeigt sind der expressionsstarke Promotor P1 und der schwache Promotor P2, die Bindestellen mit ihren Regulatoren ArcA (rot), IHF (gelb), NarL (blau) und Fis (grün), sowie die Lage der beiden Palindrome und möglichen Dam-Methylierungsstellen.

Außer den Regulatorbindestellen befinden sich im intergenischen Bereich von *nuo* weitere Kontrollelemente. Dabei handelt es sich um zwei Palindrome, die jeweils im Bereich der ArcA-Bindestellen lokalisiert sind. Weitere regulatorische Elemente für die Expression der NADH-Dehydrogenase I sind bisher nicht bekannt.

5.2 Aufbau der ArcA-Bindestellen

Die anaerobe Repression des *nuo*-Operons wird durch den Responseregulator ArcA vermittelt. ArcA gehört neben 15 weiteren Regulatoren (z.B. KdpE, PhoP, TorR, CreB) zur OmpR-Familie. Typisch für Regulatoren dieser Familie ist eine 120 bp große N-terminale Receiverdomäne und eine 120 bp große C-terminale DNA-Bindedomäne mit einem Helix-Turn-Helix Motiv. Über den Loop zwischen der zweiten und dritten Helix wird ein direkter Kontakt mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase oder dem σ -Faktor ermöglicht (Mizuno und Tanaka, 1997).

ArcA bindet spezifisch an den intergenischen Bereich vor *nuoA* (Wackwitz, 1999). Die identifizierten Bindestellen *arc1* und *arc2* sind relativ ausgedehnt und haben eine Größe von 62 bzw. 78 bp. Für die Bindung von ArcA sind häufig große Bindestellen zu beobachten (Chao *et al.*, 1997). Die Größe der Bindestellen *arc1* und *arc2* ist vergleichbar mit der anderer ArcA-Bindestellen, wie *glpI* mit 66 bp, *cydAB* mit 50 bis 75 bp (P1) (Cotter *et al.*, 1997; Lynch und Lin, 1996), *pfl* mit 94 bp (Drapal und Sawers, 1995) und *sodA* mit 65 bp (Tardat und Touati, 1993). Die ArcA-Bindestellen vor *traY*, dem Resistenzplasmid R1 mit 30 bp und von *cydAB* (P2) mit 38 bp sind kleiner (Strohmaier *et al.*, 1998; Lynch und Lin, 1996).

Innerhalb der beiden ArcA-Bindestellen *arc1* und *arc2* in der regulatorischen Region von *nuo* befinden sich mehrere ArcA-Konsensussequenzen (A/TGTTAATTAA/T). Jede Bindestelle enthält vier Konsensussequenzen. Durch Mutagenese der einzelnen Konsensussequenzen sollte herausgefunden werden, welcher Konsensus wichtig für die Bindung und somit für die Regulation durch ArcA ist.

Das ArcA-Protein bindet in seiner aktivierten Form ArcA-P an den kompletten Promotor P1+P2. Dabei sind zwei Komplexe zu beobachten. Bei Trennung der beiden Bindestellen P1*arc1* und P2*arc2* ist eine unabhängige Bindung von ArcA-P an *arc1* und *arc2* zu beobachten. In Gelretentionsanalysen der getrennten ArcA-Bindestellen sind wiederum zwei Komplexe vorhanden. Das Vorkommen mehrerer ArcA-Bindestellen ist nicht untypisch für ArcA regulierte Gene. Das *pfl*-Operon wird durch vier ArcA-Bindestellen reguliert (Drapal und Sawers, 1995). In Gelretentionsanalysen wurden für *pfl* drei verschiedene Komplexe identifiziert. Bei *glc* sind 2 ArcA Bindestellen an der Regulation beteiligt (Pellicier *et al.*,

1999a) und im regulatorischen Bereich des *sdh*-Operons sind 4 unabhängige Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität für ArcA lokalisiert (Shen *et al.*, 1997).

Das kleine Protein ArcA (27 kDA) bindet an einen relativ großen Bereich. Um die gesamte Bindestelle vor DNaseI-Verdau schützen zu können, muss es zu einer Oligomerisierung des Proteins kommen. Die Multimerisierung von ArcA ist bereits beschrieben (Drapal und Sawers, 1995a, Jeon *et al.*, 2001). Durch Erhöhung der ArcA-Konzentration kommt es im Bereich der Bindestelle *arc1* zu einer minimalen Ausweitung des geschützten Bereichs. Eine Ausweitung der geschützten Bereiche wie bei *pfl* (von 94 auf 141 bp) (Drapal und Sawers, 1995), *sdhCDAB* (von 105 auf 230 bp) (Lynch und Lin, 1996) oder *aldA* (Pellicer *et al.*, 1999b) ist für die ArcA-Bindestellen von *nuo* nicht zu beobachten.

Das Auftreten der beiden Retentionskomplexe mit dem kompletten Promotorbereich P1*arc1*+P2*arc2* könnte sich auf sequenzielle Bindung von ArcA an beide Bindestellen zurückführen lassen. ArcA-P bindet mit höherer Affinität an eine Bindestelle und bei höheren ArcA-P-Konzentrationen an die andere Bindestelle. Denkbar wäre auch, dass ArcA-P zuerst als Dimer oder Tetramer beide Bindestellen gleichzeitig besetzt (Komplex I). Anschließend bildet sich durch Multimerisierung von ArcA-P ein Protein-DNA-Komplex mit noch stärker verminderter Mobilität (Komplex II).

In dieser Arbeit wurde die unabhängige Bindung von ArcA-P an beide Bindestellen *in vitro* durch die Trennung der Bindestellen gezeigt. Damit ist unwahrscheinlich, dass die Bindung einer der Bindestellen für die Bindung der zweiten notwendig ist. Auch bei den getrennten Bindestellen lassen sich wieder zwei Retentionskomplexe identifizieren. Dafür kann es zwei Möglichkeiten geben. Innerhalb einer Bindestelle befinden sich mehrere Erkennungssequenzen oder bei zunehmender ArcA-P-Konzentration erfolgt eine Oligomerisierung, die zu einem weiteren Komplex führt. ArcA-P bindet mit unterschiedlicher Affinität an die beiden Bindestellen P1*arc1* und P2*arc2*. Während für die Bindestelle P1*arc1* Komplex I bei ArcA-P Konzentrationen $< 0,5$ erreicht wird, ist für die Bildung von Komplex I bei P2*arc2* ein K_D -Wert von $0,75 \mu\text{M}$ ArcA-P notwendig. Die ArcA-P-Konzentration für die Bildung von Komplex I für P1+P2 liegt zwischen denen der beiden Bindestellen. Unterschiede gibt es auch bei der Affinität für Komplexes II. Bei $1 \mu\text{M}$ ArcA-P ist die Bindestelle P1*arc1* bereits vollständig besetzt. Dagegen sind für die Bildung von Komplex II bei P2*arc2* und P1*arc1*+P2*arc2* höhere Konzentrationen an ArcA-P notwendig. Somit wird die Bindestelle *arc1* mit höherer Affinität als die Bindestelle *arc2* gebunden. Vergleicht man diese Werte mit anderen ArcA regulierten Promotorregionen der Gene *lctPRD*, *sdhCDAB*, *gltA*, *aldA*, *cydAB* und *icd* (Lynch und Lin, 1996, Pellicer *et al.*, 1999; Cotter *et al.*, 1997;

Shen und Gunsalus, 1997), so ist der K_D -Wert der Bindestelle $P1arc1$ dem anderer Gene ähnlich. Der K_D -Wert für $P2arc2$ ist allerdings relativ hoch. Die K_D -Werte der anderen Gene liegen zwischen 0,05 (*pfl*) und 0,75 μM (*sdhCDAB*) ArcA-P. Für die ArcA-Bindestellen des *sdhCDAB*-Operons ist bereits die Bindung der verschiedenen Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität bekannt (Shen und Gunsalus, 1997)

Ein mögliches Modell der Wechselwirkung der Bindestellen $P1arc1$ und $P2arc2$ ist die unabhängige Bindung von ArcA-P an beide Bindestellen und anschließend eine Zusammenlagerung der Bindestellen durch direkten Protein-Protein Kontakt. Diese Annahme wurde aber durch Gelretardationsversuche ausgeschlossen. Bei Bindestudien mit beiden getrennten Bindestellen in einem Ansatz war lediglich die Bindung an die getrennten Bindestellen (Abb. 36, Fall I) und keine gemeinsame Bande (Abb. 36, Fall II) zu erkennen.

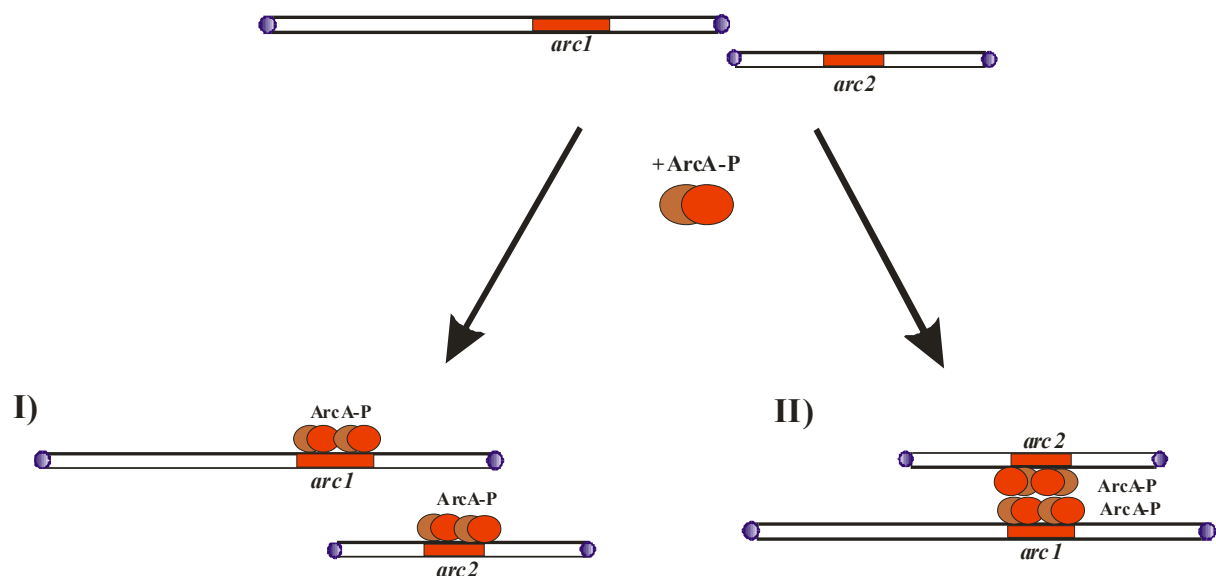


Abb. 36: Theorie zur Wechselwirkung der beiden besetzten Bindestellen *arc1* und *arc2* Gezeigt sind die beiden Fragmente mit den Bindestellen *arc1* und *arc2* (rot). Blaue Punkte zeigen die Markierung im Gelshift.

Eine weitere Möglichkeit, wie beide Bindestellen gemeinsam durch ArcA reguliert werden können, ist eine Biegung der DNA. Das Auftreten von hypersensitiven Banden beim Schutz von ArcA-P (nichtcodierender Strang) gegenüber DNaseI Verdau (Wackwitz, 1999) spricht dafür, dass die DNA bei Bindung von ArcA gebogen wird. Ähnlich wie bei *narGHIJ* (Zhang und DeMoss, 1996) oder bei *pfl* (Sawers, 1993) könnte eine Biegung der DNA zur Folge haben, dass die beiden besetzten Bindestellen in räumliche Nähe zueinander oder zur RNA-Polymerase kommen und eine Protein-Protein-Wechselwirkung stattfindet. Die Biegung der DNA durch ArcA bei ArcA-regulierten Genen, ist bereits beobachtet worden. So verursacht die Bindung von ArcA an den Promotor der Cytochrom-d-oxidase (*cydAB*), Isocitratlyase

(*icd*) und anderer Enzyme des Citratzyklus (Citratsynthase *gltA*, Succinat-Dehydrogenase, *sdhCDAB*) (Cotter et al., 1997; Chao et al., 1997; Lynch und Lin, 1996) eine Änderung der Topologie der DNA.

5.3 Der ArcA-Konsensus

Für ArcA wurde von Lynch und Lin (1996) ein ArcA-DNA-Konsensus als Erkennungssequenz vorgeschlagen (A/TGTTAATTAA/T). Der ArcA-Konsensus wurde durch Sequenzvergleiche verschiedener ArcA-Bindestellen innerhalb der geschützten Bereiche abgeleitet. Bereits Shen und Gunsalus stellten 1997 die Gültigkeit des Konsensus in Frage, da im regulatorischen Bereich des *sdhCDAB*-Promotors zwar eine Bindung durch ArcA beobachtet werden konnte, aber keine Konsensussequenz zu finden war. Um die Richtigkeit der ArcA-Konsensussequenzen vor *aldA* zu testen wurden die Konsensussequenzen in dem konservierten GTT Motiv mutiert (Pellicer *et al.*, 1999b). Die Mutationen hatten eine drastische Verminderung der Affinität von ArcA-P zum *aldA*-Promotor zur Folge und unterstützen somit die Bedeutung des GTT-Motivs. Innerhalb der beiden Bindestellen *arc1* und *arc2* befinden sich je 4 solcher Konsensussequenzen (Abb. 37). Diese Sequenzen sind in den essentiellen Basen an Position 2, 3 und 4 konserviert und besitzen über den gesamten Bereich mehr als 70 % Ähnlichkeit zu dem Konsensus. In der Bindestelle *arc1* sind alle 4 Konsensussequenzen auf dem codierenden Strang lokalisiert. In Bindestelle *arc2* befinden sich zwei Konsensussequenzen auf dem codierenden und zwei auf dem nichtcodierenden Strang.

Durch Mutagenese der 8 Konsensussequenzen sollte die Bindung und Regulation von *nuo* durch ArcA besser untersucht werden. In Gelretentionsanalysen führen nur Mutationen in den Konsensussequenzen *arc1a* und *arc1b* zu einer verminderten Affinität von ArcA zur Bindestelle P1*arc1* (Tab. 10). Alle weiteren Mutationen in *arc1c* und *arc1d* sowie in *arc2abcd* haben keinen Effekt auf die Bindung von ArcA *in vitro*.

Sowohl im komplett mutierten Promotor P1*arc1*_{abcd}+P2*arc2*_{abcd}, als auch in den getrennten mutierten Bindestellen sind wiederum zwei Komplexe zu erkennen. Zum Erreichen der beiden Komplexe sind jedoch unterschiedliche Affinitäten gegenüber dem Wildtyp notwendig. Liegt die erste Bindestelle in *arc1ab* mutiert vor, so ist für Komplex I und II eine 2 bis 2,5 fache höhere Konzentration an ArcA-P notwendig. Bei Mutagenese der zweiten Bindestelle ist lediglich die Dissoziationskonstante für Komplex II mit 2,5 µM ArcA-P erhöht. Im Gegensatz dazu führen bei *aldA* alle eingeführten Mutationen zu einer Verminderung der Affinität von ArcA an den Promotor.

		A	G	T	T	A	A	T	T	A	T	
		T										Konsensus
			C	A	G							
<i>arc1</i>	C A A T G A	T	G	T	T	A	A	A	A	A	A	<i>arc1a</i>
	C G T T T T	T	G	T	T	A	T	G	G	A	A	<i>arc1b</i>
	T A A A T T	T	G	T	T	G	C	T	G	C	G	<i>arc1c</i>
	T T G C T G	C	G	T	T	T	T	T	G	T	T	<i>arc1d</i>

<i>arc2</i>	T A A T G G	T	G	T	T	G	A	T	A	T	T	<i>arc2a</i>
	A A C T T T	T	G	T	T	A	A	A	G	T	T	<i>arc2b</i>
	A A C A A A	A	G	T	T	T	C	T	T	C	A	<i>arc2c</i> rev
	T G A T G T	G	G	T	T	T	T	T	T	A	C	<i>arc2d</i> rev

Abb. 37: Konsensussequenzen der Bindestellen *arc1* und *arc2* von *nuo*. Die Änderungen, die in diesen Studien durch Mutagenese eingeführt wurden sind rot gekennzeichnet und über der Wildtypesequenz angegeben. Die Konsensussequenzen *arc2c* und *arc2d* liegen auf dem nichtcodierenden Strang (rev).

Durch Mutation der Konsensussequenzen von *arc1* ist im Footprint der Schutz des gleichen Bereiches, wie in der nichtmutierten Bindestelle zu beobachten. Lediglich im Bereich der Mutation *arc1a* und *arc1bcd* lässt sich ein verändertes Bindungsmuster erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass ArcA-P immer noch den gleichen Bereich am *nuo*-Promotor bindet, die Bindung innerhalb dieses Bereiches jedoch verändert ist. Die Position der ArcA-P Bindung innerhalb der Bindestelle ist verschoben.

Auch die Auswirkung der Mutationen der ArcA-Bindestellen auf die Expression der entsprechenden Promotoren wurde untersucht. Unter aeroben Bedingungen, bei denen ArcA nicht aktiv ist, haben nur Mutationen der zweiten Bindestelle *arc2* einen Effekt auf die Expression von *nuo* (Tab. 10). Es kommt zu einer Derepression. Dieser Effekt ist nicht ArcA abhängig. Die Mutation von *arc2* im isolierten Promotor P2 führt mit zunehmender Mutationszahl zu einer Verdopplung der Expression unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Durch diese Mutationen werden die vier vorhanden Konsensussequenzen (*arc2abcd*) von ArcA und gleichzeitig wird durch Mutation von *arc2bc* die

Konsensussequenz von IHF mutiert. Da sich die Verdopplung der Expression sowohl in Wildtyp, *arcA*- und *ihf*-Mutante zeigt, wird dieser Effekt nicht durch die Inaktivierung der Bindestellen von ArcA und/oder IHF verursacht. Vielmehr scheint ein weiterer, bisher unbekannter Regulator oder ein Strukturelement des Promotors durch diese Mutationen betroffen zu sein.

Unter anaeroben Bedingungen reprimiert ArcA durch Bindung an seine Bindestellen die Expression von *nuo*. Nur Mutationen der Bindestelle *arcl* haben unter anaeroben Bedingungen einen dereprimierenden Effekt auf die Expression. Bereits Mutationen in *arclab* verursachen diese Derepression. Die weiteren Mutationen in *arclcd* haben keinen Effekt. Während im isolierten Promotor P1 die Mutation der Bindestelle *arclab* bereits zu einer völligen Derepression des minimalen ArcA-Effektes ausreicht, wird im gesamten Promotor die Repression um Faktor 2 aufgehoben. Diese Ergebnisse werden durch Bindestudien bestätigt.

Neben diesen Operonfusionen wurde auch der Einfluss der Promotor-Mutationen in Proteinfusionen getestet. Wie zu erwarten hatten die Promotormutationen einen ähnlichen Effekt wie bei den transkriptionellen Fusionen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass nur Mutationen in *arclab* die ArcA-abhängige Expression von *nuo* beeinflussen. Alle weiteren Mutationen des Promotors verursachen eine Derepression, die aber nicht über ArcA vermittelt wird. Der Einfluss eines weiteren Regulators oder eines *cis*-Elementes in diesem Bereich muss für diesen Effekt in Betracht gezogen werden. Um mehr über die Bindung von ArcA an verschiedene Promotorbereiche von *nuo* zu lernen, soll in Zukunft die Bindung von ArcA an die verschiedenen Bindungsstellen durch „Atomic Force“-Mikroskopie (AFM) untersucht werden.

Anhand der Mutagenesestudien kann man feststellen, dass die für ArcA postulierte Konsensussequenz für die ArcA-Bindestellen vor *nuoA* in der einfachen Form, wie sie veröffentlicht ist (Lynch und Lin, 1996), nicht bestätigt werden kann. Bei Mutagenese der acht vorhandenen Konsensussequenzen hatten lediglich zwei einen Effekt auf die Regulation von *nuo* durch ArcA.

Von McGuire et al (1999) wurde eine neue ArcA-Konsensussequenz vorgeschlagen:

GTTAATTAAATGTTA	McGuire <i>et al.</i> , 1999
^A / _T GTTAATTA ^T / _A	Lynch und Lin, 1996

In der ArcA-Bindestelle *arc2* befindet sich ein Abschnitt, in dem 11 der 15 bp des McGuire Konsensus konserviert sind. Diese Sequenz wurde bisher nicht durch Mutagenese der Konsensussequenzen *arc2abcd* verändert. In der Bindestelle *arc1* konnte eine potentielle Konsensussequenz in 10/15 Basen gefunden werden. Diese liegt im Bereich der *arc1a* Konsensussequenz und wurde durch Mutagenese bereits betroffen. Möglicherweise wäre es sinnvoll die Funktion dieser Konsensussequenzen vor *nuo* zu überprüfen.

Tab. 10: Einfluss der Mutationen in den ArcA-Konsensusstellen von *nuo* auf die Bindung und Expressionskontrolle von ArcA (Zusammenfassung). Mit + gekennzeichnete Mutationen haben einen Einfluss, - bedeutet keinen Effekt.

Mutation	Bindung von ArcA		Derepression von <i>nuo</i>		
	Effekt	Änderung K_D	Aerob	Anaerob	ArcA abhängig
<i>arc1ab</i>	+	1/2	-	+	ja
<i>arc1cd</i>	-	-	-	-	nein
<i>arc2ab</i>	-	-	+	-	nein
<i>arc2cd</i>	-	-	+	-	nein

5.4 Transkriptionskontrolle der beiden *nuo*-Promotoren

Die Transkriptionskontrolle des *nuo*-Operons wird nicht nur durch eine sequenzspezifische Protein-DNA Wechselwirkung, sondern auch durch eine Wechselwirkung mehrerer Proteine, die in räumlicher Nähe zueinander liegen, bewirkt. Vor *nuoA* überlappen die Bindestellen *arc1* mit *fis3* und die Bindestellen *arc2* mit *ihf* (Abb. 38). Für den ersten Promotor wurde keine Abhängigkeit von IHF und nur eine schwache Abhängigkeit von ArcA nachgewiesen. Dieser Promotor besitzt unter aeroben Bedingungen eine starke Expression, die unter anaeroben Bedingungen noch weiter gesteigert wird. Dagegen handelt es sich bei Promotor P2 um einen sehr schwachen Promotor, der allerdings unter anaeroben Bedingungen stark durch ArcA und nur schwach durch IHF reprimiert wird. Eine anaerobe Aktivierung von P2 ist nicht zu erkennen. Somit werden beiden Promotoren unterschiedliche Rollen zugewiesen. Promotor P1 ist der Hauptpromotor, der für die Expressionsstärke verantwortlich ist. Dies zeigt sich auch an der Expressionssteigerung unter anaeroben Bedingungen, die bei P2 nicht vorhanden ist. Dagegen scheint Promotor P2 für die transkriptionelle Regulation von *nuo*

durch die beiden Regulatoren ArcA und IHF verantwortlich zu sein. Die Zusammenfassung des Aufbaus und der spezifischen Regulation von Promotor P1, P2 und P1+P2 sind in Abb. 38 und Tab. 11 dargestellt.

Eine ähnliche Situation ist für die Regulation von *cydAB* (cytochrome d oxidase) zu beobachten (Cotter *et al.*, 1997). Die zwei Promotoren von *cydAB* (Cotter *et al.*, 1997) oder *gltA* (Park *et al.*, 1994) liegen 113 bzw. 103 bp voneinander entfernt. Die Regulation des *nuo*-Operons erfolgt ebenfalls über zwei σ^{70} regulierte Promotoren die 113 bp auseinander liegen. Von den beiden Promotoren bei *cydAB* wird Promotor 1 von ArcA reguliert. Promotor 2 dagegen zeigt keine Abhängigkeit von Regulatoren. Dieser Promotor ist ebenso wie Promotor P1 von *nuo* für die Expressionstärke verantwortlich. Bei *cydAB* reguliert zusätzlich FNR die Expression. Auf die Expression von *nuo* besitzt FNR dagegen nur einen indirekten Effekt (Bongaerts *et al.*, 1995), der wahrscheinlich über dessen regulatorischen Einfluss auf die Expression von ArcA vermittelt wird (Compan und Touati, 1994). Im *pfl*-Operon, das durch 7 Promotoren reguliert wird, sind die beiden Promotoren P6 und P7 für die anaerobe Regulation verantwortlich sind. Der Effekt beider Promotoren von *nuo* ist ebenso wie bei *pfl*, nicht additiv. Promotor P7 vermittelt die Feinabstimmung der ArcA-Regulation des *pfl*-Operons. Beide Promotoren sind für die anaerobe Regulation des *pfl*-Operons notwendig

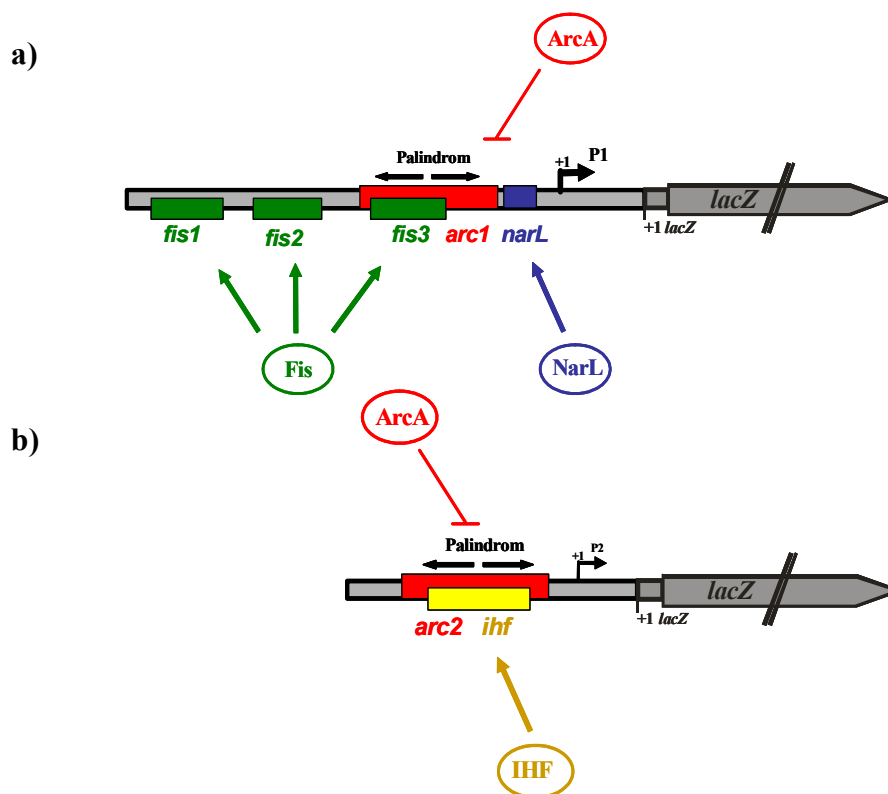


Abb. 38: Zusammenfassung des Aufbaus von Promotor P1 (a) und P2 (b). Gezeigt sind die beiden getrennten Promotoren mit den Bindestelle für ArcA (rot), IHF (gelb), NarL (blau) und Fis (grün), sowie die Palindrome (schwarze Pfeile).

Tab. 11: Zusammenfassung des Aufbaus und der Expression von Promotor P1, P2 und P1+P2. Die Repression ist durch **—** und die Aktivierung durch **+** gezeigt. **— —** bedeutet starke Repression. Die Bedingungen der Regulation sind in Klammern angegeben.

	Promotor P1	Promotor P2	Promotor P1+P2
Regulatorbindestellen	<i>arc1, narL</i> <i>fis1, fis2, fis3</i>	<i>arc2, ihf</i>	<i>arc1, arc2,</i> <i>narL, ihf,</i> <i>fis1, fis2, fis3</i>
regulatorische Elemente	Palindrom in <i>arc1</i>	Palindrom in <i>arc2</i>	Palindrom in <i>arc1</i> und <i>arc2</i>
Expression:			
aerob	stark	schwach	zwischen P1 und P2
anaerob	Steigerung zu aerob	keine Steigerung	Steigerung zu aerob
			P1 und P2 nicht additiv
Regulation durch:	— ArcA (N ₂)	— — ArcA (N ₂), — IHF (N ₂)	— ArcA (N ₂), — IHF (N ₂), + Fis (log), + NarL (NO ₃ ⁻)

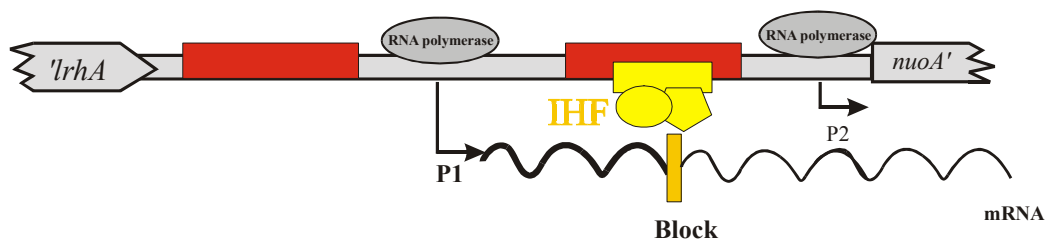
Für die Regulation des *nuo*-Operons ist der komplette intergenische Bereich von 650 bp notwendig. Bisher konnte noch nicht ausgeschlossen werden, dass sich im Bereich beider Promotoren Strukturelemente befinden, die für Expression des jeweils anderen Promotors bzw. die Gesamtexpression notwendig sind. Der Mechanismus dieser wechselseitigen Regulation ist bisher nicht bekannt.

5.5 Modell zur Expressionskontrolle des *nuoA-N* Operons

Im intergenischen Bereich vor *nuoA* befinden sich wie bereits beschrieben (vgl. 5.4) viele Regulatorbindestellen. Stromabwärts von Promotor P1 befinden sich die beiden Bindestellen *arc2* und *ihf*. Bindet IHF und/oder ArcA an diese Bindestellen, so kann es zu einer Störung der Transkription kommen. Wie bei *nuo* überlappt im *ompF*-Promotor die IHF Bindestelle mit einem Regulator der OmpR-Familie, mit OmpR (Ramani *et al.*, 1992). Dort blockiert IHF die Transkription, indem es eine Biegung in die DNA einführt. Ähnlich könnte IHF auch die Regulation von *nuo* beeinflussen. Diese physische Regulation von *nuo* könnte wie folgt aussehen:

- A) Unter aeroben Bedingungen bindet IHF an seine Bindestelle und hemmt mit oder ohne Biegung die Expression von Promotor P1, indem IHF die Elongation der Transkription blockiert (Abb. 39a).
- B) Unter anaeroben Bedingungen ist zusätzlich zur IHF-Bindestelle auch die ArcA-Bindestelle besetzt. Ebenso wie unter aeroben Bedingungen ist auch hier eine Blockierung der Elongation der Transkription von P1 möglich, diesmal allerdings durch ArcA und IHF (Abb. 39b).

a) aerob



b) anaerob

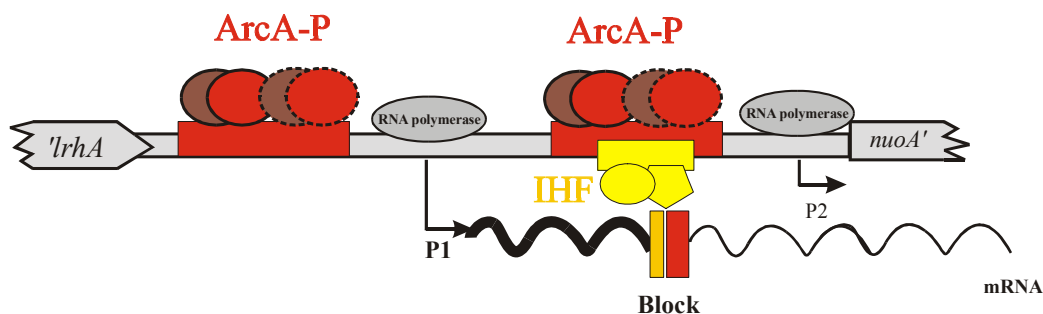


Abb. 39: Physische Hemmung der Transkription von Promotor P1 unter aeroben (a) und anaeroben (b) Bedingungen durch stromab-sitzende Regulatoren. Gezeigt sind die ArcA-Bindestellen (rot), IHF-Bindestelle (gelb) und die beiden Promotoren P1 und P2. Eingezeichnet ist das Transkript (relative Stärke aerob und anaerob) von P1 (mRNA) und die Blockierung der Transkription durch IHF (gelb) und ArcA (rot).

Zusätzlich zu der Störung der Transkription durch stromab-sitzende Regulatoren ist für die Regulation von *nuo* eine Interaktion der Regulatoren denkbar. Die Regulation durch Interaktionen von Transkriptionsfaktoren erfordert eine gebogene oder verdrehte DNA-Konformation um die erforderlichen Proteine zueinander zu positionieren (Bewley *et al.*, 1998). Konformationsänderungen werden durch Proteine ausgelöst, deren Hauptfunktion darin liegt eine Biegung in die DNA einzuführen oder durch andere Proteine, die bei ihrer eigentlichen Funktion, als DNA-bindende Aktivatoren oder Repressoren sozusagen zusätzlich eine Biegung in die DNA einführen.

Zu dem ersten Proteintyp gehört das IHF-Protein. IHF ist ein kleines heterodimeres Protein, das spezifisch an DNA bindet und die Architektur prokaryotischer DNAs beeinflusst (Rice *et*

al., 1996; Gossen und van de Putte, 1995). Eine mögliche Funktion des IHF bei *nuo* könnte die Biegung der DNA sein. Dadurch werden andere DNA-bindende Proteine in ihrer Funktion beeinflusst (Ramani *et al.*, 1992) und entweder in räumliche Nähe zueinander oder zur RNA-Polymerase gebracht.

Auch die beiden möglichen Dam-Methylierungsstellen GATC (Pos -149 und -277) könnten an der Regulation von *nuo* beteiligt sein. *In silico* Sequenzanalysen haben gezeigt, dass die Verteilung von GATC-Sequenzen nicht zufällig ist. Oftmals überlappen sie Erkennungssequenzen von Regulatoren oder der RNA-Polymerase und sind als wichtiges Element der globalen Genregulation erkannt worden (Oshima *et al.*, 2002). Durch Methylierung der DNA wird die Bindung von IHF an die DNA verstärkt (Polaczek *et al.*, 1997). Dam-Methylierung verursacht eine transkriptionelle Kontrolle vieler Gene des Energiestoffwechsels und der Atmung (Oshima *et al.*, 2002).

IHF ist mit dem unspezifisch an die DNA bindenden Protein HU verwandt. Dieses Protein biegt auch DNA-Moleküle. Mitglieder dieser Familie sind weit verbreitet in Prokaryoten (Oberto und Rouviere-Yaniv, 1996). Eine mögliche Beteiligung von HU an der Regulation von *nuo* ist nicht auszuschließen.

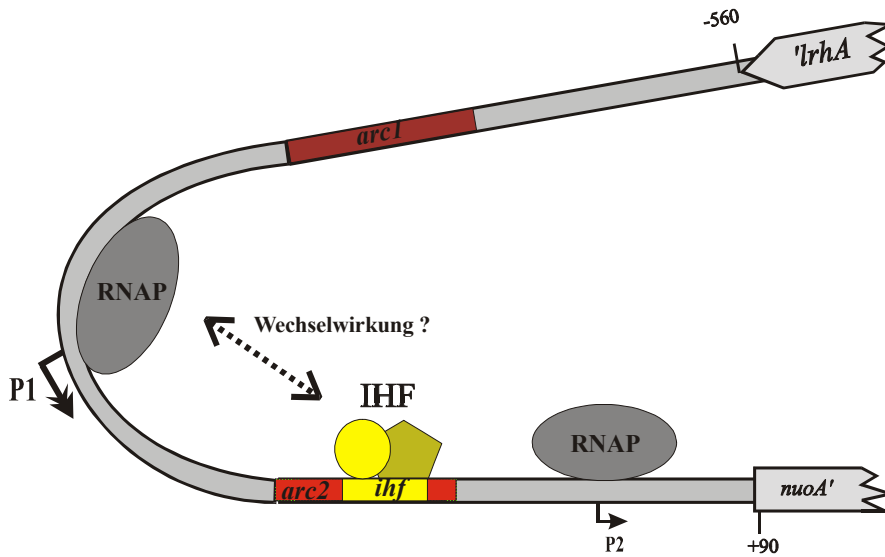
Zur zweiten Gruppe der Proteine zählt das Fis-Protein. Im *rrnB*-Promotor wird die Aktivität des Promotors durch das Fis Protein aktiviert. Fis verursacht dabei eine Biegung der DNA und kann somit mit der RNA-Polymerase in Wechselwirkung treten (Zhang und Bremer, 1996).

Unter anaeroben Bedingungen nimmt die negative Überspiralisierung der DNA zu (Dorman, 1988). Für viele prokaryotische Gene ist eine Regulation über den Spiralisierungszustand der DNA bekannt (Dorman, 1995; Schrum und Hassan, 1992; Grau *et al.*, 1994). Die Regulation durch den superhelikalen Zustand der DNA ist bereits für *cydAB* beschrieben (Bebington und Williams, 2001).

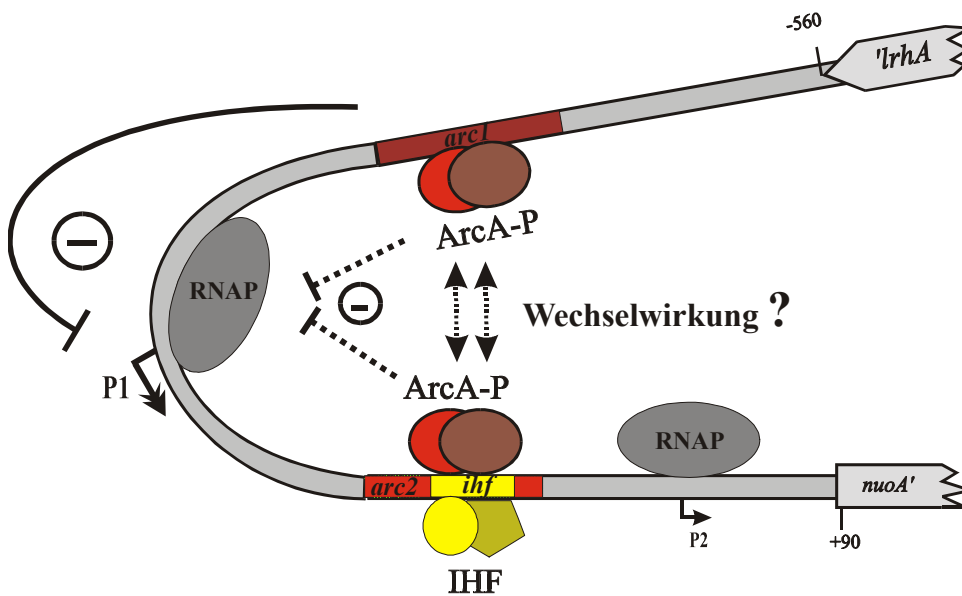
Die Besetzung der verschiedenen Regulatorbindestellen der intergenischen Region von *nuo* erfolgt unterschiedlich unter aeroben, anaeroben Bedingungen und in der früh logarithmischen Phase. Unter aeroben Bedingungen ist die IHF-Bindestelle besetzt (Abb. 40a) IHF führt eine Biegung in die DNA ein und beeinflusst so die Expression, indem IHF selbst als Repressor fungiert. Für diesen Effekt geben die Expressionsdaten unterschiedliche Hinweise. Unter anaeroben Bedingungen sind, neben der IHF Bindestelle, die beiden ArcA-Bindestellen *arc1* und *arc2* mit ArcA-P besetzt (Abb. 40b). IHF und/oder ArcA verändern die Topologie der DNA so, dass es zu einer Repression der Expression kommt. Dies kann durch

eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen ArcA-ArcA oder ArcA-RNAP (P1 und/oder P2) verursacht werden. Für die Wechselwirkung von ArcA-ArcA gibt es anhand der Bindungsstudien und Expressionsdaten bisher keinen direkten Hinweis. In der früh logarithmischen Phase sind Fis und IHF an ihre Bindestellen im intergenischen Bereich von *nuo* gebunden (Abb. 40c). Durch Biegung der DNA kann Fis die Expression von P1 und/oder P2 aktivieren.

a) aerob



b) anaerob



c) logarithmische Phase

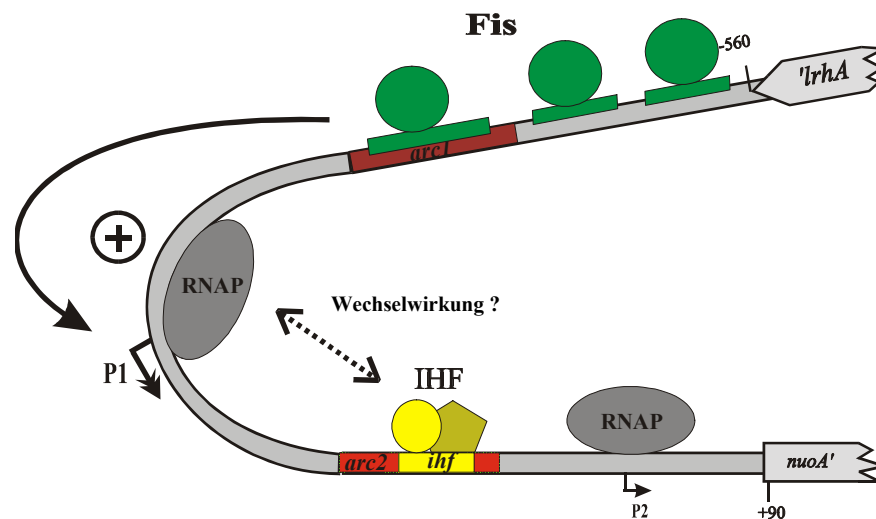


Abb. 40: Modell der Regulation von *nuo* durch Interaktion von Regulatoren unter aeroben (a), anaeroben (b) Bedingungen und in der logarithmischen Phase (c). Gezeigt sind die beiden Bindestellen *arc1* und *arc2* (rot), die IHF-Bindestelle (gelb) und die Fis-Bindestelle (grün).

(a) Unter aeroben Bedingungen kommt es durch Bindung von IHF zu einer Biegung der DNA. Durch eine Wechselwirkung von IHF mit der RNAP kann es zur Repression von P1 kommen.

(b) Unter anaeroben Bedingungen wird die DNA wiederum durch Bindung von IHF gebogen und es kann zu einer Wechselwirkung zwischen ArcA-ArcA kommen. Dadurch wird die Expression von P1 reprimiert oder ArcA interagiert direkt mit der RNAP.

(c) In der logarithmischen Phase bindet das Fis-Protein an seine Bindestellen und aktiviert die Expression von *nuo*. Durch Biegung der DNA könnte Fis in die Nähe der RNAP gebracht werden und durch direkte Wechselwirkung mit dieser die Expression von P1 aktivieren.

Die Biegung der DNA durch IHF ist für die Regulation von *nuo* an einer für IHF untypischen Stelle dargestellt. Normalerweise bindet IHF im Scheitelpunkt der Biegung. Für diese Modelle der Regulation von *nuo* wäre eine Biegung der DNA an anderer Stelle eher hinderlich.

All diese Ansätze sind nur Teilbereiche der komplizierten Regulation des *nuoA-N* Operons.

Um mehr über das Modell der Regulation von *nuo* sagen zu können sind weitere Versuche notwendig. Wichtig wäre es durch Inaktivierung der -10-Region die Promotor P1 und P2 getrennt auszuschalten. Somit könnte man den Einfluss des kompletten regulatorischen Bereiches untersuchen. Auch eine mögliche Biegung sollte untersucht werden. Das Auftreten von hypersensitiven Stellen im Footprint spricht auch für eine Biegung der DNA (Pellicer et al., 1999). Auch die Beteiligung einer antisense RNA ähnlich wie bei der *ompF* Regulation muss in Betracht gezogen werden (Padraig et al., 2000).

5.6 Glucoserepression, welches Protein ist daran beteiligt?

Bei der Kohlenstoff-Katabolit-Repression (CCR: carbon catabolit repression) handelt es sich um einen regulatorischen Mechanismus, bei dem die Expression vieler Gene durch die Anwesenheit von C-Quellen, wie Glucose, Fructose oder Mannitol reprimiert wird. Die Regulation der NADH-Dehydrogenase I durch die C-Quelle ist bisher nur teilweise untersucht worden. C₄-Dicarboxylate (Fumarat) und Aminosäuren stimulieren die Expression von *nuoA-N*, während Glucose die Expression hemmt (Bongaerts *et al.*, 1995, diese Arbeit). Der molekulare Mechanismus dieser Glucoserepression ist noch völlig unbekannt. Glucose steht im Mittelpunkt des Energiestoffwechsels innerhalb der Zelle, da beim Wachstum von *E. coli* auf Glucose die größte Wachstumsrate erzielt wird. Glucose ist ein Zucker, der über zwei PTS-Systeme (Phospho-Transferase-System) in die Zelle transportiert werden kann (PtsG und ManXYZ), wobei intrazelluläres Glucose-6-P produziert wird. In Anwesenheit von Glucose aktiviert ein bisher unbekannter Mechanismus das *pts*-Operon (*ptsH*, *ptsI*, *crr*) (DeReuse und Danchin, 1991; DeReuse *et al.*, 1992; Ryu und Garges, 1994). Die Hauptkomponenten des PT-Systems sind das HPr-Protein (Histidinenhaltenden Phosphocarrier) und die Enzyme I (EI) und EIIB^{Glc} (Postma *et al.*, 1996). Das PT-System wird durch den Regulator Mlc negativ beeinflusst (Plumbridge, 1999; Plumbridge, 2002; Plumbridge, 1998; Lee *et al.*, 2000).

Neben dem klassischen CRP- und cAMP-Regulationssystem besitzt *E. coli* weitere Proteine, die an der Glucoseregulation beteiligt sein können. Dies sind Cra (FruR), Mlc und NagC (Plumbridge, 2001a; Ramseier *et al.*, 1995). Durch Expressionsstudien in *mlc*-, *nagC*- und *cya* negativen Stämmen konnte eine Beteiligung dieser Proteine an der Glucoserepression von *nuo* ausgeschlossen werden. Die minimale Erhöhung der Expression durch Zugabe von externem cAMP ist vermutlich auf einen indirekten Effekt zurückzuführen. Ebenso ist die physiologische Rolle der Glucoserepression von *nuo* bisher nicht bekannt.

Im Promotorbereich von *nuo* befindet sich eine potentielle Konsensussequenz (5' GCTGAAN C/GNT 3' in Position -177 bis -186 vor *nuo*) für die Bindung des alternativen Glucose-regulators Cra (Catabolic-Repressor-Aktivator-Protein: früher auch FruR). Eine Untersuchung einer möglichen Beteiligung von Cra an der Regulation von *nuo* wäre sinnvoll (Abb. 41b).

Eine weitere Möglichkeit ist die Beteiligung eines anderen bisher unidentifizierten regulatorischen Elementes an der Glucoseregulation von *nuo*. Ähnlich wie bei *sdhCDAB* könnte die Glucoserepression auch von dem *ptsG* Gen abhängig sein, das für das Protein EIICB^{Glc} kodiert (Takeda *et al.*, 1999). EIICB^{Glc} ist eine Komponente des Hauptglucosetransporters. Wahrscheinlich erfolgt eine mögliche Regulation von *nuo* durch EIICB^{Glc} nicht direkt, da bisher keine DNA-bindenden Eigenschaften für das

cytoplasmatische EIICB^{Glc} bekannt sind. Das EIICB^{Glc} muss seinen regulatorischen Effekt auf *nuo* ebenso wie bei *sdhCDAB* über einen anderen Mechanismus ausüben (Takeda *et al.*, 1999). Reuse und Dauchin haben für die Glucose-Aktivierung ein Zweikomponentensystem vorgeschlagen, wobei EIICB^{Glc} als Sensor fungiert (Abb. 41a).

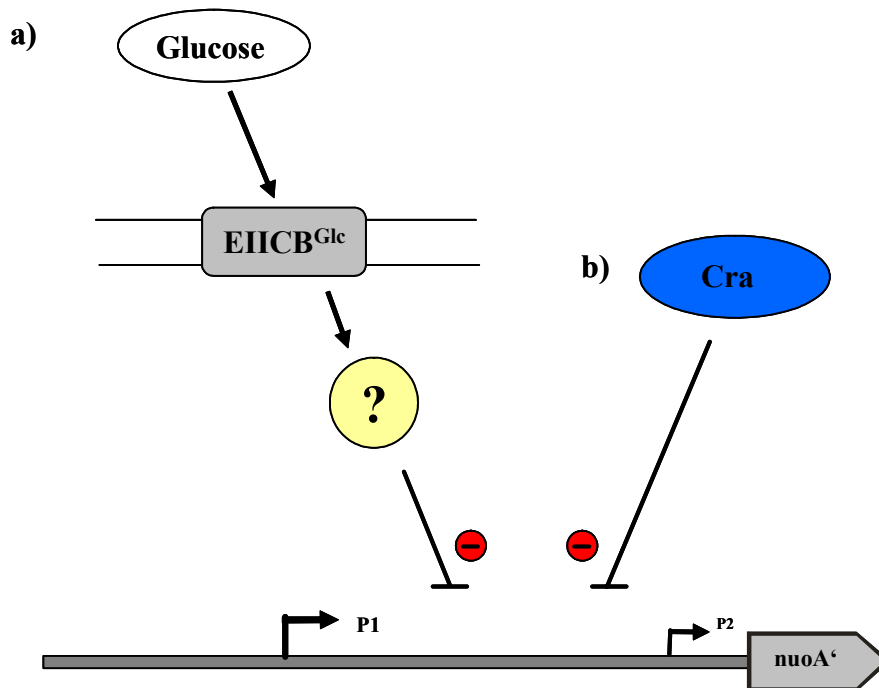


Abb. 41: Mögliche Regulation der Glucoserepression durch (a) EIICB^{Glc} des PTS-Systems oder durch (b) das Cra-Protein. Gezeigt sind der Glucoseregulator Cra (blau) und das EIICB^{Glc} (grau), das zusammen mit einem unbekannten Regulator in Anwesenheit von Glucose die Expression von *nuo* reprimiert.

Der dazugehörige Responseregulator ist bisher noch nicht bekannt (DeReuse und Danchin, 1991; DeReuse *et al.*, 1992). Das heißt, dass die Glucoseregulation über eine Signaltransduktion vermittelt werden könnte, die vom Phosphorylierungszustand von EIICB^{Glc} und somit von Glucose als externes Signal abhängig ist.

Auch eine Beteiligung des Responseregulators ArcA an der Glucoseregulation wird bereits diskutiert. Bei der Glucoserepression von *gltA* (Park *et al.*, 1994) und bei *mdh* (Park *et al.*, 1995) wird ein Mitwirken von ArcA an dieser Regulation vorgeschlagen.

5.7 Funktion der beiden Palindrome im intergenischen Bereich vor *nuoA'*

Palindrome sind wichtige regulatorische Elemente innerhalb des Genoms. Das Vorkommen palindromer Sequenzen ist notwendig für mögliche Haarnadelstrukturen in der mRNA, die für die Labilität des Genoms essentiell sind (Sinden, 1994). Sie haben außerdem eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription, Translation und anderer biologischer Funktionen

einer Vielzahl von Genen, zum Beispiel im *lac* Operator (Sadler *et al.*, 1983; Simons *et al.*, 1984; Wadkins, 2000; Blatt *et al.*, 1993). Mit bioinformatischen Methoden wurde die Zahl der Palindrome für *E. coli* (Schroth und Shing Ho, 1995) und einige andere Organismen untersucht. *E. coli* und *Haemophilus influenzae* besitzen sehr viele Palindrome. *Synechocystis* dagegen besitzt nur wenige dieser Strukturen (Schroth und Shing Ho, 1995). Durch Analyse der statistischen Verteilung der Palindrome in den nichtcodierenden Regionen kann man ihre potentielle biologische Funktion ableiten. Bei den bioinformatischen Untersuchungen wurden drei verschiedene Typen gefunden: TypA, das Palindrom befindet sich in der nichtcodierenden Region zwischen zwei divergenten Genen (5' gegen 5'-Ende der Gene). TypB, das Palindrom befindet sich in der nichtcodierenden Region zwischen zwei hintereinander liegenden Genen (3' gegen 5'-Ende der Gene). TypC, das Palindrom befindet sich in der nichtcodierende Region zwischen zwei konvergenten Genen (3' gegen 3'-Ende der Gene). Die nichtcodierenden Regionen von Typ A und C verbindet verschiedenen Operons. Die Region von Typ B gehört eventuell zum gleichen Operon.

Die nichtcodierende Region vor *nuoA* kann dem TypB zugeordnet werden. Den beiden Palindromen konnte bisher noch keine physiologische Rolle bei der Regulation der NADH-Dehydrogenase I zugewiesen werden. Trotz großer Ähnlichkeit zu den Konsensussequenzen von Mlc und NagC, sind es keine Bindestellen für diese. Häufig sind solche palindrome Sequenzen an einer Rho-unabhängigen Termination der Transkription beteiligt (Lillo *et al.*, 2002). Diese Beteiligung ist bei den Sequenzen von *nuo* unwahrscheinlich, da das Palindrom in der Bindestelle *arcI* stromauf der Promotoren lokalisiert ist und somit nicht in mRNA überschrieben wird. Eine mögliche Regulation auf RNA-Ebene kann somit durch die Lage der identifizierten Promotoren ausgeschlossen werden.

Auffällig ist die Lage der beiden Palindrome innerhalb der beiden ArcA-Bindestellen. So könnte es, bei Bindung eines weiteren Regulators an diese Sequenzen zu einer Konkurrenz um den Platz innerhalb der Bindestelle kommen und somit zur Modifizierung der Regulation unter bestimmten aeroben bzw. anaeroben Bedingungen. Diese Annahme ist aber spekulativ. Der Vergleich beider Palindrome legt eine Ähnlichkeit zu der Erkennungssequenz von Mitgliedern der LacI-Familie nahe (Abb. 42). Diese Sequenzen erlauben Repressoren wie LacI oder GalR, DNA-Loops zu bilden und damit die Transkription zu reprimieren (Lewis *et al.*, 1999).

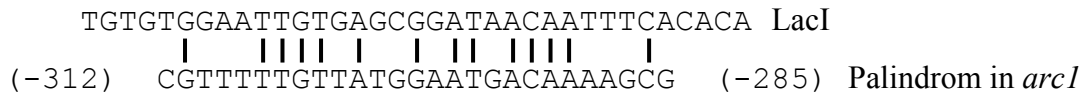


Abb. 42. Vergleich der Konsensussequenz von LacI mit dem Palindrom in *arc1*. Gleiche Basen sind mit Strichen gekennzeichnet. Ähnlich verhält es sich mit dem zweiten Palindrom in *arc2*.

In dem *uhpT* Promotor, der die Expression des Zucker-Transport-Systems in *E. coli* kontrolliert, befindet sich eine kleine und eine große palindrome Sequenz, die beide an der Promotorfunktion beteiligt sind (Chen und Kadner, 2000). Beide Sequenzen werden von den Bindestellen für UhpA überlappt. Die Rolle oder der Beitrag dieser Motive an der Transkription von *uhpT* ist bisher nicht bekannt. Für die beiden Palindrome im intergenischen Bereich vor *nuoA* konnte eine Ähnlichkeit zu der großen palindromen Sequenz von *uhpT* gefunden werden (Abb. 43).



Abb. 43: Vergleich des großen Palindroms von *uhpT* mit dem Palindrom von *nuo* am Beispiel von in *arc1*

Weiterhin muss auch die Rolle der Palindrome als *cis*-wirkendes Strukturelement in Betracht gezogen werden, wie es für die *nrdA* und *nrdB* Expression vorgeschlagen wird (Jacobson *et al.*, 1998a; Jacobson *et al.*, 1998b). Der Aufbau des *nuo*-Promotors gleicht dem des *nrd*-Gens (Wackwitz, 1999). Die Rolle und Funktion der beiden Palindrome im *nuo*-Promotor muss weiterhin experimentell untersucht werden.

5.8. *In vitro* Transkription

Für die Promotorerkennung bakterieller Gene ist das RNA-Polymerase-Kernenzym mit dem jeweiligen σ -Faktor notwendig (Helmann, 1999). *E. coli* besitzt 7 verschiedene σ Untereinheiten: σ^{70} (*rpoD*), σ^{54} (*rpoN*), σ^{32} (*rpoH*), σ^S (*rpoS*), σ^E (*rpoE*), σ^{28} (*rpoF*) und σ^{FecI} (*fecI*). Jede dieser Untereinheiten ist spezifisch für bestimmte Promotorstrukturen und beeinflusst deren Genexpression (Gross *et al.*, 1992, Gaal *et al.*, 2001). Die meisten Gene in *E. coli* sind E σ^{70} reguliert. Dazu gehören auch die beiden Promotoren P1 und P2 vor *nuo*. Bei der *in vitro* Transkription der beiden Promotoren ist jeweils ein Transkript gebildet worden. Die Menge der beiden erhaltenen Transkripte ist sehr gering. Das spricht dafür, dass weitere Regulatoren für eine optimale Transkription fehlen. So kann z.B. der Transkriptionsregulator

Fis notwendig sein, um optimale Transkriptionsraten zu erhalten. Der Transkriptionsstartpunkt P2 wurde *in vitro* bestätigt. Bei *in vitro* Transkriptionsversuchen mit ArcA-P war keine Repression der Transkription zu erkennen. Dies könnte daran liegen, dass es auf Grund der *per se* schwachen Transkription schwierig ist, weitere Transkriptionsunterschiede zu detektieren. Zur Optimierung der Transkription *in vitro* sind weitere Versuche unbedingt notwendig. Primäres Ziel muss es sein, durch experimentelle Veränderung die *in vitro* Transkriptionsrate zu verbessern, um damit die Repression durch verschiedene Regulatoren zeigen zu können.

5.9 NarL Regulation des *nuoA-N* Operons

Unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor wird die Expression der NADH-Dehydrogenase I durch NarL aktiviert. NarL gehört zur Familie der FixJ und LuxR transkriptionellen Regulatoren. Eine Einordnung in die OmpR-Familie wird diskutiert (Baikalov et al., 1996). Die N-terminale Receiverdomäne von NarL besteht aus 131 Aminosäuren und bildet eine Sekundärstruktur aus 5 β -Faltblättern verbunden durch 5 α -Helices. In der C-terminalen 62 Aminosäuren großen Domäne befindet sich das Helix-Turn-Helix Motiv, zur Bindung an die Ziel-DNA. Die spezifische Erkennungssequenz für NarL besteht aus einem Heptamer mit: T-A-C-Y-N-M-T (Li und Stewart, 1992).

NarL reprimiert Gene wie *frdABCD* (Gunsalus et al., 1989;), *adhE* (Gunsalus et al., 1989; Membrillo und Lin, 1999) und aktiviert Gene wie *narGHIJ* (Darwin et al., 1996; Zhang und DeMoos, 1996), *narK* (Stewart, 1993) und *fdnGHI* (Darwin et al., 1996; Li und Stewart, 1992).

Das 24 kDa große NarL-Protein konnte als Fusionsprotein gereinigt werden. Durch Phosphorylierung an dem konservierten Aspartat-Rest D-59 erfolgt die Übertragung der Phosphatgruppe von NarX auf seinen zugehörigen Responseregulator NarL. Das NarL wird dadurch in seine aktivierte Form NarL-P umgewandelt und kann an seine Ziel-DNA binden. NarL-P bindet als Dimer an die Bindestellen. Durch *in vitro* Phosphorylierung ist es möglich 50 % des NarL zu phosphorylieren. Mit diesem NarL-P wurde die bereits postulierte Bindestelle von NarL (Bongaerts et al., 1995) an Position -263 identifiziert. Obwohl im Bereich des Promotors von *nuo* noch weitere Konsensussequenzen von NarL bei Position -120 und -201 lokalisiert sind, wurden keine weiteren Bindestellen identifiziert.

Die unmittelbare Lage der identifizierten Konsensussequenz hinter der Bindestelle *arc1* und die Lage des Konsensus bei -120 bp innerhalb der Bindestelle *arc2* lässt auf eine Wechselwirkung zwischen NarL und ArcA schließen. Versuche mit den mutierten

Bindestellen *arc1* und *arc2* bestätigen diese Vermutung. Durch Mutagenese wird die durch NarL vermittelte Repression von *nuo* aufgehoben. Auffällig ist, dass unter anaeroben Bedingungen bei Anwesenheit von Nitrat auch Mutationen der zweiten Bindestelle *arc2* einen dereprimierenden Effekt besitzen. Die Art und Weise der Wechselwirkung ist bisher nicht bekannt. NarL ist ein Protein, das mit verschiedenen Proteinen gemeinsam ein Operon regulieren kann. Oftmals reguliert NarL zusammen mit FNR: *narGHIJ* (Schroder *et al.*, 1993), *narQ* (Cavicchioli *et al.*, 1996), *napF* (Choe *et al.*, 1993), *cydDC* (Cook *et al.*, 1997). Eine direkte Wechselwirkung von ArcA und NarL bzw. FNR und NarL ist bisher nicht bekannt.

6. Veröffentlichungen

Uden G, Achebach S, Holighaus G, Tran HG, Wackwitz B, Zeuner Y (2002). Control of FNR function of *Escherichia coli* by O₂ and reducing conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol.* May;4 (3): 263-8

Zeuner Y, Wackwitz B, Bongaerts J, Uden G (2002). Transcriptional regulation of the NADH-Dehydrogenase I of *Escherichia coli* by the anaerobic regulator ArcA. in preparation

Tran QH, Achebach S, Vlamis-Gardikas A, Zeuner Y, Ohlberger G, Holmgren A and Uden G (2002). Reconstitution of [4Fe-4S] (FNR) from apoFNR *in vitro*: stimulation by *Escherichia coli* glutaredoxins 1, 2 and 3. submitted

7. Literatur

- Adhya S, Gottesman M (1982) Promoter occlusion: transcription through a promoter may inhibit its activity. *Cell* 29(3):939-44
- Aiba H (1983) Autoregulation of the *Escherichia coli crp* gene: CRP is transcriptional repressor for its own gene. *Cell* 32 141-149
- Baikalov I, Schroder I, Kaczor-Grzeskowiak M, Grzeskowiak K, Gunsalus RP, Dickerson RE (1996) Structure of *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochem* 35(24):11053-61
- Bebbington KJ, Williams HD (2001) A role for DNA supercoiling in the regulation of the cytochrome bd oxidase in *Escherichia coli*. *Microbiol* 147:591-598
- Bewley CA, Gronenborn AM, Clore GM (1998) Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27:105-31
- Blatt NB, Osborne SE, Cain RJ, Glick GD (1993) Conformational studies of hairpin sequences from the ColE1 cruciform. *Biochimie* 75(6):433-41
- Bongaerts J, Zoske S, Weidner U, Uuden G (1995) Transcriptional regulation of the proton translocating NADH dehydrogenase genes (*nuoA-N*) of *Escherichia coli* by electron acceptors, electron donors and gene regulators. *Mol Microbiol* May;16(3):521-34
- Bongaerts J (1996) Regulation und physiologische Funktion der NADH-Dehydrogenase I aus *Escherichia coli*. Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Busby S and Ebricht RH (1993) Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 79:743- 746
- Calhoun MW, Oden KL, Gennis RB, Teixeira de Mattos MJ, Neijssel OM (1993) Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J Bacteriol* 175:3020-3025
- Calhoun MW, Gennis RB (1993) Demonstration of separate genetic loci encoding distinct membrane bound respiratory NADH dehydrogenases in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175:3013-3019
- Cavicchioli R, T Kolesnikow, RC Chiang, and RP Gunsalus (1996) Characterization of the *aeoA* locus of *Escherichia coli*: control of gene expression in response to anaerobiosis and nitrate. *J Bac* 178: 6968-6974

- Chao G, Shen J, Tseng CP, Park SJ, Gunsalus RP (1997) Aerobic regulation of isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) expression in *Escherichia coli* by the *arcA* and *fnr* gene products. *J Bacteriol* 179:4299-4304
- Chen Q, Kadner JR (2000) Effect of altered spacing between uhpT Promoter elements on transcription activation. *J Bac* 182:4430-4436
- Chen WP, Kuo TT (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 21(9):2260
- Choe M, WS Reznikoff (1993) Identification of the regulatory sequence of anaerobically expressed locus *aeg-46.5*. *J Bac* 175: 1165-1172
- Collado-Vides J, Magasanik B, Gralla JD (1991) Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 55(3):371-94
- Cook GM, J Membrillo-Hernandez, RK Poole (1997) Transcriptional regulation of the *cydDC* operon, encoding a heterodimeric ABC transporter required for assembly of cytochromes *c* and *bd* in *Escherichia coli* K-12: regulation by oxygen and alternative electron acceptors. *J Bac* 179: 6525-6530
- Compan I, Touati D (1994) Anaerobic activation of *arcA* transcription in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA. *Mol Microbiol Mar*;11(5):955-64
- Cotter PA, Melville SB, Albrecht JA, Gunsalus RP (1997) Aerobic regulation of cytochrome *d* oxidase (*cydAB*) operon expression in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA in repression and activation. *Mol Microbiol Aug*;25(3):605-15
- Darwin AJ, J Li, V Stewart (1996) Analysis of nitrate regulatory protein NarL-binding sites in the *fdnG* and *narG* operon control regions of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 20:621-632
- De Reuse H, Danchin A (1991) Positive regulation of the *pts* operon of *Escherichia coli*: genetic evidence for a signal transduction mechanism. *J Bacteriol* 173(2):727-33
- De Reuse H, Kolb A, Danchin A (1992) Positive regulation of the expression of the *Escherichia coli pts* operon. Identification of the regulatory regions. *J Mol Biol* 226(3):623-35
- Drapal N, Sawers G (1995) Promoter 7 of the *Escherichia coli pfl* operon is a major determinant in the anaerobic regulation of expression by ArcA. *J Bacteriol Sep*;177(18):5338-41
- Dorman CJ, Barr GC, Bhriain NN, Higgins CF (1988) DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J Bacteriol* 170(6):2816-26

- Dorman CJ (1995) DNA topology and the global control of bacterial gene expression: implication for the regulation of virulence gene expression. Flemming Lecture
- Drapal N, Sawers G (1995a) Purification of ArcA and analysis of its specific interaction with the *pfl* promoter-regulatory region. Mol Microbiol 16:597-607
- Farinha MA, Kropinski AM (1990) High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions. FEMS Microbiol Lett 58(2):221-5
- Friedman DI (1988) Integration host factor: A protein for all reasons. Cell 55:545-554
- Friedrich T, Steinmüller K, Weiss H (1995) The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. FEBS Letters 367:107-111
- Gaal T, Ross W, Estrem ST, Nguyen LH, Burgess RR, Gourse RL (2001) Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase. Mol Microbiol 42(4):939-54
- Georgellis D, Kwon O, Lin ECC (2001) Quinones as the redox signal for the Arc two component system of bacteria. Sciencs Vol 292:2314-2316
- Goodrich JA und McClure (1991) Competing promoters in prokaryotic transcription. Elsevier Science Publicher TIBS 16:394-397
- Goosen N, van der Putte P (1995) The regulation of transcription initiation by integration host factor. Mol Microbiol 16:1-7
- Govantes F, Albrecht JA, Gunsalus RP (2000a) Oxygen regulation of the *Escherichia coli* cytochrome d oxidase (*cydAB*) operon: roles of multiple promoters and the *fnr-1* and *fnr-2* binding sites. Mol Microbiol Sep;37(6):1456-69
- Govantes F, Orjalo AV, Gunsalus RP (2000b) Interplay between three global regulatory proteins mediates oxygen regulation of the *Escherichia coli* cytochrome d oxidase (*cydAB*) operon. Mol Microbiol Dec;38(5):1061-1073
- Guest JR, Green J, Irvine AS, Spiro S (1996) The FNR modulon and FNR-regulated gene expression, p.317-342. In Lin ECC and Lynch AS (ed.) Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Chapman Hall, New York, NY
- Gunsalus RP (1992) Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes. J Bacteriol 174:7069-7074
- Grau R, Gardiol D, Glikin GC, de Mendoza D (1994) DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 11(5):933-41

- Green J, Guest JR (1994) Regulation of transcription at the *ndh* promoter of *Escherichia coli* by FNR and novel factors. *Mol Microbiol* 12:433-444
- Green J, Anjum MF, Guest JR (1996) The *ndh*-binding protein (Nbp) regulates the *ndh* gene of *Escherichia coli* in response to growth phase and is identical to Fis. *Mol Microbiol* 20: 1043-1055
- Green J, Anjum MF, Guest JR (1997) Regulation of the *ndh* gene of *Escherichia coli* by integration host factor and a novel regulator, *Arch Microbiology* 134:2865-2875
- Gross C, Lonetto M and Lorisick R (1992) Bacterial sigma factors. In McKnight SL and Yamamoto K (Hrsg) *Transcriptional Regulation* Cold Spring Harbour Laboratory Press Cold Spring Harbour New York Vol 1:129-176
- Gunsalus RP, Kalman LV, Stewart RR (1989) Nucleotide sequence of the *narL* gene that is involved in global regulation of nitrate controlled respiratory genes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 17(5):1965-75
- Hanamura A and Aiba H (1991), Molecular mechanism of negative autoregulation of *Escherichia coli crp* gene. *Nucleic Acids Res* 19:4413-4419
- Helmann JD and Chamberlain MJ (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Ann Rev Biochem* 57:839-872
- Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 4(1):193-7
- Ishihama A (1993) Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J Bacteriol* 175:1283-1289
- Iuchi, S, Cameron DC, Lin ECC (1989) A second global regulatory gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171:868-873
- Iuchi S, Lin ECC (1988) *ArcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1888-1892
- Iuchi S, Lin ECC (1993) Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol Microbiol* 9:9-15
- Iuchi S, Lin ECC (1995) Signal transduction in the Arc system for control of operons encoding aerobic respiratory enzymes. pp223-231. In Hoch JA, Silhavy TJ (eds) *Two component signal transduction*. ASM Press, Washington DC
- Iuchi S, Lin ECC (1991) Adaption of *Escherichia coli* to respiratory conditions: regulation of gene expression. *Cell* 66:5-7
- Jacobson BA, Fuchs JA (1998a) A 45 bp inverted repeat is required for cell cycle regulation of the *Escherichia coli nrd* operon. *Mol Microbiol* 28:1307-1314

- Jacobson BA, Fuchs JA (1998b) Multiple *cis*-acting sites positively regulate *Escherichia coli nrd* expression. *Mol Microbiol* 28:1315-1322
- Jeon Y, Lee YS, Han JS, Kim JB, Hwang DS (2001) Multimerisation of phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. *J of Biol Chem* Vol276(44):40873-40879
- Kimata K, Inada T, Tagami H und Aiba H (1998) Repressor responsible for glucose induction of the *ptsG*-gene. *Mol Microbiol* 29:1509-1519
- KnausR, Bujard H (1988) PL of coliphage lambda: an alternative solution for an efficie promotor. *EMBO* 7(9):2919-23
- Lee SJ, Boos W, Bouche JP, Plumbridge J (2000) Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *EMBO J* 19(20):5353-61
- Leif H, Sled VD, Ohnishi T, Weiss H, Friedrich T (1995) Isolation and characterization of the proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 230(2):538-548
- Lewis DE, Geanacopoulos M, Adhya S (1999) Role of HU supercoiling in transcription repression: specialized nucleoprotein repression complex al *gal* promoters in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31(2):451-61
- Li J, V Stewart (1992) Localization of upstream sequence elements required for nitrate and anaerobic induction of *fdn* (formate dehydrogenase-N) operon expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bac* 174: 4935-4942
- Lillo F, Basile S, Mantegna RN (2002) Comparative genomics study of inverted repeats in bacteria. *Bioinformatics* 18(7):971-9
- Lynch AS, Lin ECC (1996) Transcriptional control mediated by the ArcA two component response regulator protein of *Escherichia coli*: Characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* 178:6238-6249
- Matsushika A, Mizuno T (1998) A dual-signaling mechanism mediated by the ArcB hybrid sensor kinase containing the histidine-containing phosphotransfer domain in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180:3973-3977
- Matsushita K, Onishi T, Kaback HR (1987) NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiration chain. *Biochem* 26:7732-7737
- McGuire AM, De Wulf P, Church GM, Lin ECC (1999) A weight matrix for binding recognition by the redox-response regulator ArcA-P of *Escherichia coli*. *Mol Micobiol* 32 217-221

- Membrillo-Hernández J, EC Lin (1999) Regulation of Expression of the *adhE* Gene, Encoding Ethanol Oxidoreductase in *Escherichia coli*: Transcription from a Downstream Promoter and Regulation by Fnr and RpoS. *J Bac* 181: 7571-7579
- Miller JH (1992) *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mizuno T, Tanaka I (1997) Structure of the DNA-binding domain of the OmpR family of response regulators. *Mol Microbiol* 24:665-670
- Nasser W, Rochman M und Muskhelishvili (2002) Transcriptional regulation of *fis* operon involves a module of multile coupled promoters. *EMBO* 21(4):715-724
- Newlands J, Josaitis C, Ross W and Gourse R (1992) Both *fis*-dependent and factor independent upstream activation of the *rrnB* P1 Promoter are face of the helix dependent. *Nucl Acids Res* 20: 719-726
- Oberto J, Rouviere-Yaniv J (1996) *Serratia marcescens* contains a heterodimeric HU protein like *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 178(1):293-7
- Opel M Afrin S and Hatfield G (2001), The Effects of DNA supercoiling on the expression of operons of the *ilv* regulon of *Escherichia coli* suggest a physiological rationale for divergently transcribed operons. *Mol Microbiol* 39:1109–1115
- Oshima T, Wada C, Kawagoe Y, Ara T, Maeda M, Masuda Y, Hiraga S, Mori H (2002) Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45(3):673-95
- Ostrow KS, Silhavy TJ, Garrett S (1986) *Cis*-acting sites required for osmoregulation of *ompF* expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 168:1165-1171
- Park SJ, McCabe J, Turna J, Gunsalus RP (1994) Regulation of the citrate synthase (*gltA*) gene of *Escherichia coli* in response to anaerobiosis and carbon supply: role of the *arcA* gene product. *J Bacteriol* Aug;176(16):5086-92
- Park SJ, Cotter PA, Gunsalus RP (1995) Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability. *J Bacteriol* 177(22):6652-6
- Pellicer MT, Fernandez C, Badia J, Aguilar J, Lin EC, Baldom L (1999a) Cross-induction of *glc* and *ace* operons of *Escherichia coli* attributable to pathway intersection. Characterization of the *glc* promoter. *J Biol Chem* Jan 15;274(3):1745-52
- Pellicer MT, Lynch AS, De Wulf P, Boyd D, Aguilar J, Lin EC. (1999b) A mutational study of the ArcA-P binding sequences in the *aldA* promoter of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* Feb;261(1):170-6
- Perez-Rueda E, Collado-Vides J (2000) The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 28(8):1838-47

- Plumbridge J (2002) Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc. *Curr Opin Microbiol* 5(2):187-93
- Plumbridge J (2001) Regulation of PTS gene expression by the homologous transcriptional regulators, Mlc and NagC, in *Escherichia coli* (or how two similar repressors can behave differently). *J Mol Microbiol Biotechnol* 3(3):371-80
- Plumbridge J (2001) DNA binding sites for the Mlc and NagC proteins: regulation of *nagE*, encoding the N-acetylglucosamine-specific transporter in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 29(2):506-14
- Plumbridge J (1999) Expression of the phosphotransferase system both mediates and is mediated by Mlc regulation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 33(2):260-73
- Plumbridge J (1998) Expression of *ptsG*, the gene for the major glucose PTS transporter in *Escherichia coli*, is repressed by Mlc and induced by growth on glucose. *Mol Microbiol* 29(4):1053-63
- Plumbridge JA (1991) Repression and induction of the *nag* regulon of *Escherichia coli* K-12: the roles of *nagC* and *nagA* in maintenance of the uninduced state. *Mol Microbiol* (8):2053-62
- Polaczek P, Kwan K, Liberias DA, Campbell JL (1997) Role of architectural elements in combinatorial regulation of initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 26(2):261-75
- Postma PW, Lengler JW, Jacobson GR (1996) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cell and Mol Biol ASM Press, Washington DC* 206-216
- Pradraig D, Free A und Dorman (2000) A role for the *Escherichia coli* H-NS-like protein StpA in OmpF porin expression through modulation of *micF* RNA stability. *Mol Microbiol* 38(1):126-139
- Ramani N, Huang L, Freundlich M (1992) In vitro interactions of integration host factor with the *ompF* promoter-regulatory region of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 231(2):248-55
- Ramseier, TM, Bledig S, Michotey V, Feghali R, Saier Jr MH (1995) The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16:1157-1169
- Rao L, Ross W, Appleman J, Gaal T, Schlax P, Record M, Gourse R (1994) Factor independent activation of *rrmB* P1. An "extended" promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength. *J Mol Biol* 235:1421-1435

- Ross W, Gosink K, Salomon J, Igarashi K, Zou C, Ishilama A, Severinov K, Gourse R (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262:1407-1413
- Ryu S, Garges S (1994) Promoter switch in the *Escherichia coli pts* operon. *J Biol Chem* 269(7):4767-72
- Sadler JR, Sasmor H, Betz JL (1983) A perfectly symmetric *lac* operator binds the *lac* repressor very tightly. *Proc Natl Acad Sci USA* 80(22):6785-9
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning, A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nickeln S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- Sawers G (1993) Specific transcriptional requirements for positive regulation of the anaerobically inducible *pfl* operon by ArcA and FNR. *Mol Microbiol* Nov;10(4):737-47
- Sawers G, Suppmann B (1992) Anaerobic induction of pyruvate formate-lyase gene expression is mediated by the ArcA and FNR proteins. *J Bacteriol* 171:3474-3478
- Schroder I, Darie S, Gunsalus RP (1993) Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*narGHJI*) operon by NarL and Fnr requires integration host factor. *J Biol Chem* 268(2):771-4
- Schroth GP, Ho PS (1995) Occurrence of potential cruciform and H-DNA forming sequences in genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 23(11):1977-83
- Schrum LW, Hassan HM (1992) Transcriptional regulation of Mn-superoxide dismutase gene (*sodA*) of *Escherichia coli* is stimulated by DNA gyrase inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 299(1):185-92
- Shaw DJ, Guest JR (1982) Nucleotide sequence of the *fnr* gene and primary structure of the Fnr protein of *Escherichia coli*. *Nucl Acids Res* 10:6119-6230
- Shen J, Gunsalus RP (1997) Role of multiple ArcA recognition sites in anaerobic regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 26:223-236
- Silhavy TJ, Berman M, Enquist LW (1984) *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Simons A, Tils D, von Wilcken-Bergmann B, Muller-Hill B (1984) Possible ideal lac operator: *Escherichia coli* lac operator-like sequences from eukaryotic genomes lack the central G X C pair. Proc Natl Acad Sci USA 81(6):1624-8
- Sinden RR, Broyles SS, Pettijohn DE (1983) Perfect palindromic lac operator DNA sequence exists as a stable cruciform structure in supercoiled DNA in vitro but not in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 80(7):1797-801
- Spehr V, Schlitt A, Scheide D, Guènebaut V, Friedrichs V (1999) Overexpression of the *E. coli* nuo-Operon and Isolation of the overproduced NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). Biochemistry (38):16261-16267
- Stewart V (1993) Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 9:425-434
- Stewart V, Rabin RS (1995) Dual sensors and dual response regulators interact to control nitrate and nitrite-responsive gene expression in *Escherichia coli*. In: Two component signal transduction, Hoch JA and Silhavy TJ(eds.), ASM Press, Washington DC, pp233-252
- Strohmaier H, Noiges R, Kotschan S, Sawers G, Högenauer G, Zechner E, Koraimann G (1998) Characterization of the role of ArcA in regulating conjugative transfer of the resistance plasmid P1. J Mol Biol 277:309-316
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol 189:113-130
- Takeda S, Matsushika A, Mizuno T (1999) Repression of the gene encoding succinate dehydrogenase in response to glucose is mediated by the EIICB(Glc) protein in *Escherichia coli*. J Biochem (Tokyo) 126(2):354-360
- Tan M, Engel JN (1996) Identification of sequences necessary for transcription *in vitro* from the *Chlamydia trachomatis* rRNA P1 promoter. J Bacteriol 178(23):6975-82
- Tardat B, Touati D (1993) Iron and oxygen regulation of *Escherichia coli* MnSOD expression: competition between the global regulators Fur and ArcA for binding to DNA. Mol Microbiol 9(1):53-63
- Tardat B, Touati D (1993) Iron and oxygen regulation of *Escherichia coli* MnSOD expression: competition between the global regulators Fur and ArcA for binding to DNA. Mol Microbiol 9:53-63
- Tran QH, Uden G (1998) Changes in proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. Eur J Biochem 251:538-543
- Tran QH, Bongaerts J, Vlad D, Uden G (1997) Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase I of *Escherichia coli* in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetic implications. Eur J Biochem 244:155-160

- Tsung K, Brissette RE, Inouye M (1990) Enhancement of RNA polymerase binding to promoters by a transcriptional activator, OmpR, in *Escherichia coli*: its positive and negative effects on transcription. Proc Natl Acad Sci USA 87(15):5940-4
- Tsuzuki M, Ishige K, Mizuno T (1995) Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcB, of *Escherichia coli*: *in vitro* studies with mutants. Mol Microbiol 18:953-962
- Uden G, Becker S, Bongaerts J, Schirawski J, Six S (1994) Oxygen regulated gene expression in facultative anaerobic bacteria. Ant Leeuwenhoek 66:3-23
- Uden G (1998) Transcriptional regulation and energetics of alternative respiratory pathways in facultatively anaerobic bacteria. Biochim Biophys Acta 1365:220-224
- Uden G, Bongaerts J (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. Biochim Biophys Acta 1320:217-234
- Uden G, Schirawski J (1997) The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions. Mol Microbiol (2):205-210
- Wadkins RM (2000) Targeting DNA secondary structures. Curr Med Chem 7(1):1-15
- Wackwitz B, Bongaerts J, Goodman SD, Uden G (1999) Growth phase dependent regulation of *nuoA-N* expression of *Escherichia coli* K-12 by the Fis protein: DNA binding and bioenergetic significance. Mol Gen Genetics, Dec (262):876-83
- Wackwitz (1999) Transcriptional regulation of the NADH dehydrogenase I (*nuoA-N* operon) in *Escherichia coli* by ArcA, Fis and IHF. Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Weidner U, Geier S, Ptock A, Friedrich T, Leif H, Weiss H (1993) The gene locus of the proton translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*: organization of the 14 genes and relationship of the derived proteins with subunits of mitochondrial complex I. J Mol Biol 233:109-122
- Yager K and Hippel PH (1987) Transcript elongation and termination. In Neidhart FC (Hrsg.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. American Society for Microbiology Washington S.1242-1275
- Young IG, Rogers BL, Campbell HD, Jaworowski A, Shaw DC (1981) Nucleotide sequence coding for the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli*. Eur J Biochem 116:165-170
- Zhang X, Bremer H (1996) Effects of Fis on ribosome synthesis and activity and on rRNA promoter activities in *Escherichia coli*. J Mol Biol 259(1):27-40
- Zhang X, JA DeMoss (1996) Structure modification induced in the *narG* promoter by binding of integration host factor and NarL-P. J Bac 178:3971-3973

8. Anhang

Zusammenstellung aller Messungen der transkriptionellen (P1+P2-*lacZ*) und translationellen (*nuoA'*-*lacZ*) *lacZ*-Fusionen:

Anhang1: Expression von P1+P2-*lacZ* (598 bp) (Wildtyp und *arc1* + *arc2* Mutanten) bei aerober und anaerober Zucht mit Glucose. Gezeigt sind Wildtyp (IMW367^(a), IMW347^(b), IMW384^(c), IMW349^(d), IMW422^(e), IMW351^(f), IMW383^(g), IMW413^(h)) und *arcA*-Mutante (IMW368^(a), IMW348^(b), IMW359^(c), IMW420^(d), IMW423^(e), IMW352^(f), IMW419^(g), IMW412^(h)).

Stämme (Genotyp)	β-Galaktosidase [MU]			
	<i>Wt</i>		<i>arcA</i> ⁻	
	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂
P1 <i>arc1</i> +P2 <i>arc2</i> ^(a)	47	60	45	132
P1 <i>arc1</i> _{ab} +P2 <i>arc2</i> ^(b)	45	122	42	144
P1 <i>arc1</i> _{abcd} +P2 <i>arc2</i> ^(c)	49	104	49	159
P1 <i>arc1</i> +P2 <i>arc2</i> _{abcd} ^(d)	76	63	67	196
P1 <i>arc1</i> _{ab} +P2 <i>arc2</i> _{ab} ^(e)	66	105	57	197
P1 <i>arc1</i> _{ab} +P2 <i>arc2</i> _{abcd} ^(f)	78	97	47	217
P1 <i>arc1</i> _{abcd} +P2 <i>arc2</i> _{ab} ^(g)	50	106	49	159
P1 <i>arc1</i> _{abcd} +P2 <i>arc2</i> _{abcd} ^(h)	92	110	83	124

Anhang 2: Einfluss von *ihf* und *arcA* auf die Expression von *nuoA'*-*lacZ* (Wildtyp und *arc1/arc2* Mutanten). Die Zucht erfolgte unter aeroben (O₂) und anaeroben (N₂) Bedingungen in M9-Medium mit Glucose als C-Quelle. Gezeigt sind die Stämme IMW33^(a), IMW286^(b), IMW341^(c), IMW344^(d), IMW303^(e), IMW307^(f) (*Wt*), IMW37^(a), IMW288^(b), IMW343^(c), IMW346^(d), IMW304^(e), IMW308^(f) (*ihf*⁻), IMW35^(a), IMW287^(b), IMW342^(c), IMW345^(d), IMW308^(e), IMW309^(f) (*arcA*⁻).

Stämme (Genotyp)	β-Galaktosidase [MU]							
	<i>Wt</i>		<i>arcA</i> ⁻		<i>ihf</i> ⁻			
	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂	O ₂	N ₂
<i>nuoA'</i> - <i>lacZ</i> ^(a)	91	75	87	231	115	83		
<i>nuoA'</i> - <i>lacZ</i> (<i>1ab</i> + <i>2wt</i>) ^(b)	87	145	92	255	116	156		
<i>nuoA'</i> - <i>lacZ</i> (<i>1wt</i> + <i>2ab</i>) ^(e)	131	67	125	269	119	97		
<i>nuoA'</i> - <i>lacZ</i> (<i>1wt</i> + <i>2abcd</i>) ^(c)	126	73	142	275	151	132		
<i>nuoA'</i> - <i>lacZ</i> (<i>1ab</i> + <i>2ab</i>) ^(f)	130	148	118	267	124	165		
<i>nuoA'</i> - <i>lacZ</i> (<i>1ab</i> + <i>2abcd</i>) ^(d)	146	136	148	273	145	140		