

**Charakterisierung des DxxxQ-Phosphatasemotivs des
Sauerstoffsensors NreB in *Staphylococcus carnosus***

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ann-Katrin Kretzschmar

geboren am 22.06.1985 in Frankfurt/Main

Mainz, Februar 2019

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2019

Für Opa Münster.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Anpassung an Umweltbedingungen durch Zweikomponentensysteme	3
2.2 Regulation der anaeroben Atmung	4
2.3 Regulation der anaeroben Nitratatmung von <i>S. carnosus</i> durch NreABC	5
2.4 Kontrolle der Aktivität von Antwortregulatoren	10
2.5 Das DxxxQ-Phosphatasemotiv	12
2.6 Ziele der Arbeit	13
3. Material und Methode	14
3.1 Stämme und Plasmide	14
3.2 Medien und Zuchten	15
3.3 Molekulargenetische Methoden	18
3.4 Biochemische Methoden	25
4. Ergebnisse	33
4.1 NreB enthält ein DxxxQ-Phosphatasemotiv	33
4.2 Einfluss der Varianten des NreB(DxxxQ)-Motivs auf die <i>narG-lip</i> Expression	34
4.3 Anaerobes Wachstum von Varianten des NreB(DxxxQ)-Motivs	37
4.4 Die Autophosphorylierung der NreB(DxxxQ)-Varianten	41
4.5 NreB(Q164)-Varianten übertragen die Phosphorylgruppe auf NreC	46
4.6 Die Dephosphorylierung von NreC- ³³ P ist bei den NreB(Q164)-Varianten verzögert ...	46
4.7 Stabilität von NreC- ³³ P	48
4.8 NreC- ³³ P zeigt NreB-unterstützte intrinsische Phosphataseaktivität	50
4.9 Dephosphorylierung von NreC- ³³ P durch NreB(DxxxQ)-Varianten	51
4.10 Charakterisierung von NreB(H159Q)	54
4.11 Aktivität des Antwortregulators NreC ohne NreAB	57
4.12 Phosphorylierung von NreC mit Carbamoylphosphat	57
5. Diskussion	61
5.1 Die konservierten Aminosäurereste des Phosphatasemotivs haben unterschiedliche Funktionen	62

5.2 Rolle des DxxxQ-Motivs im Sauerstoffsensor NreB von <i>S. carnosus</i>	63
5.3 Die Bedeutung von NreB(D160)	64
5.4 Die Bedeutung von NreB(Q164)	65
5.5 NreA hat keinen Einfluss auf die Dephosphorylierung von NreC-P	68
5.6 Die intrinsische Autophosphataseaktivität von NreC	69
5.7 <i>In vivo</i> Aktivität von NreC hängt von NreAB ab.....	69
5.8 Weitere wichtige Aminosäuren für die NreC-Phosphorylierung	70
5.9 Bedeutung des Stimulus für die Phosphataseaktivität	71
5.10 Arbeitsmodell zur Regulation der NreC-Aktivität.....	71
5.11 NreB(H159): Nicht die alleinige Phosphorylierungsstelle?	73
6. Literatur.....	75
I Anhang	82
I.1 Anhang zu Material und Methode	82
I.2 Anhang zu Ergebnissen	85
II Lebenslauf	86
III Veröffentlichungen	87
IV Danksagung.....	88
V Erklärung	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acc.	Accession number (UniprotKB)
Amp	Ampicillin
Arc	Anoxic redox control
ATP	Adenosintriphosphat
BACTH	Bacterial Two-Hybrid System
BM	Basic-Medium
bp	Basenpaar
BV	Bettvolumen
CA	Catalytic and ATP-Binding
Cam	Choramphenicol
DHp	Dimerization and Histidine phosphotransfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	decay per minute
E_0'	Elektronenpotential
Ery	Erythromycin
FNR	Fumarate-Nitrate-Regulator
HK	Hauptkultur
$H_2O_{dest.}$	destilliertes Wasser
HPINE	His-Tag-Protein Interaktionsexperiment
IOD	integrale optische Dichte
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LB	Luria-Bertani
Ni^{2+} -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
Nre	Nitrogen regulation
$OD_{(578)}$	optische Dichte (bei 578 nm)
PAS	PER-ARNT-SIM
PCR	Polymeraseketten-Reaktion
R	Resistenz
rpm	round per minute
SDS(-PAGE)	Sodiumdodecylsulfat(-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SOC	Derivat von SOB (super optimal broth)-Medium
SPINE	Strep-Tag-Protein Interaktionsexperiment
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
TM	Schmelztemperatur
TMAO	Trimethylaminoxid
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV/Vis	Ultraviolett/Visuell
VK	Vorkultur
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp
ZKS	Zweikomponentensystem

1. Zusammenfassung

In Bakterien regulieren Zweikomponentensysteme die Stoffwechselwege abhängig von den die Bakterien umgebenden Stimuli. Die Signaltransduktion erfolgt mittels Phosphoryltransfer von der den Reiz detektierenden Sensorhistidinkinase auf den Antwortregulator, welcher die spezifische Zellantwort auslöst. Dabei ist die Aktivierung des Antwortregulators durch Phosphorylierung und auch dessen Inaktivierung durch Dephosphorylierung von entscheidender Bedeutung. Das Gleichgewicht von Phosphorylierung und Dephosphorylierung gewährleistet die korrekte Adaptation des Stoffwechsels an die Stimuli. In HisKA_3 Sensorhistidinkinasen wurde ein DxxxQ-Phosphatasemotiv identifiziert, dessen konservierte Aminosäuren in der Regulation der Kinase- und Phosphataseaktivität der Sensoren eine entscheidende Rolle spielen.

Das fakultativ anaerobe Bakterium *Staphylococcus carnosus* reguliert die anaerobe Nitratatmung über das NreBC-Zweikomponentensystem und den Nitratsensor NreA. Der Sauerstoffsensor NreB enthält ebenfalls ein DxxxQ-Motiv, dessen Funktion für NreB in der Regulation der anaeroben Nitratatmung *in vivo* und *in vitro* untersucht wurde. Die Funktion des konservierten Aspartatrests NreB(D160) konnte aufgrund von sich widersprechenden *in vivo* und *in vitro* Ergebnissen nicht eindeutig bestätigt werden. Varianten zeigten in *in vivo* Reportergenstudien eine durch Nitrat stimulierbare wildtypische Aktivität, während sie *in vitro* keine Autophosphorylierungsaktivität hatten. Der konservierte Glutaminrest NreB(Q164) spielt dagegen eine Rolle in der Dephosphorylierung des Antwortregulators. In Varianten ist die Dephosphorylierung von NreC sowohl *in vivo* wie *in vitro* gehemmt. Zusätzlich zur Phosphataseaktivität des Sensors NreB wird die Dephosphorylierung des Antwortregulators teilweise auch durch eine intrinsische Phosphataseaktivität von NreC katalysiert. Der Nitratsensor NreA hat keinen Einfluss auf die Dephosphorylierung von NreC. Der Phosphoryltransfer im NreBC-Zweikomponentensystem erfolgt von NreB(H159) auf NreC(D53). *In vivo* Reportergenstudien weisen auf eine zusätzliche, NreB(H159) unabhängige Aktivierung des Systems hin, während durch *in vitro* Phosphorylierungen des Antwortregulators NreC mit dem niedermolekularen Phosphodonor Carbamoylphosphat der konservierte Aspartatrest NreC(D53) als einziges Phosphorylierungsziel identifiziert wurde. Als Alternative zu Phosphorylierungsstudien mittels radioaktiv markiertem [γ - ^{33}P]-ATP wurde der Nachweis mittels phospho-affinem Phos-tag etabliert.

Abstract

In bacteria two-component systems regulate metabolic pathways depending on different stimuli. The signal transduction takes place by means of phosphoryl transfer from the sensor histidine kinase to the response regulator, which triggers the specific cell response. The activation of the response regulator by phosphorylation and its inactivation by dephosphorylation is of crucial importance. The balance of phosphorylation and dephosphorylation ensures the correct adaptation of the metabolism to the stimuli. In HisKA_3 sensor histidine kinases, a DxxxQ phosphatase motif has been identified, whose conserved amino acids play a crucial role in the regulation of the kinase and phosphatase activity of the sensors.

The facultative anaerobic bacterium *Staphylococcus carnosus* regulates anaerobic nitrate respiration via the NreBC two-component system and the nitrate sensor NreA. The oxygen sensor NreB contains a DxxxQ motif whose function for NreB has been studied in the regulation of anaerobic respiration *in vivo* and *in vitro*. The function of the conserved aspartate residue NreB(D160) could not be clearly confirmed due to contradictory results. *In vivo*, Variants of this residue had a wild-typ phenotype whereas there was no detectable *in vitro* autophosphorylation activity. The conserved glutamine residue NreB(Q164) is involved in the dephosphorylation of the response regulator NreC. In variants the dephosphorylation of NreC is inhibited both *in vivo* and *in vitro*. In addition to the phosphatase activity of the NreB sensor, dephosphorylation of the response regulator is also catalyzed by an intrinsic NreC phosphatase activity. The nitrate sensor NreA has no influence on the dephosphorylation.

Phosphoryl transfer in the NreBC two-component system occurs from NreB(H159) to NreC(D53). *In vivo* reporter gene studies indicate an additional NreB(H159) independent activation of the system, while *in vitro* phosphorylation of NreC with the low molecular weight phospho-donor carbamoyl phosphate identified the conserved aspartate residue NreC(D53) as the sole phosphorylation target. As an alternative to phosphorylation studies using radioactively labeled [γ - ^{33}P]-ATP, a detection system using Phos-tag was established.

2. Einleitung

2.1 Anpassung an Umweltbedingungen durch Zweikomponentensysteme

Bakterien sind in der Umwelt stets wechselnden Bedingungen ausgesetzt. Diese sind u.a. die Verfügbarkeit von Sauerstoff, schwankende Temperaturen und pH-Werte sowie Nährstoffangebote. Um sich an ihr änderndes Milieu anzupassen, besitzen Bakterien Zweikomponentensysteme (ZKS). Diese kommen in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien, aber auch in Archaeen und Eukaryoten vor (Stock *et al.*, 1989; Stock *et al.*, 2000). Bakterien enthalten durchschnittlich etwa zwei Dutzend verschiedene ZKS (Barakat *et al.*, 2011). ZKS bestehen aus einem Sensor, der den jeweiligen Reiz detektiert und einem Antwortregulator, der die spezifische Reaktion als Antwort auf den Reiz auslöst (Stock *et al.*, 1989). Die Dauer der jeweiligen Antwort kann von wenigen Sekunden bis hin zu mehreren Stunden und länger reichen (Stock *et al.*, 1989). Die Signalweiterleitung erfolgt durch den Phosphoryltransfer vom Sensor auf den Antwortregulator. Der Sensor wird an einem konservierten Histidinrest ATP-abhängig phosphoryliert und daher auch als Sensorhistidinkinase bezeichnet. Der Phosphorylrest wird auf einen konservierten Aspartatrest des Antwortregulators übertragen, der aktiviert die spezifische Reaktion auslöst z.B. Aktivierung der Genregulation oder Chemotaxis (Stock *et al.*, 1989; Stock *et al.*, 2000).

Sensorhistidinkinasen bestehen im einfachsten Fall aus einer variablen N-terminalen Sensordomäne und einer konservierten C-terminalen Kinasedomäne (Stock *et al.*, 2000). Die Sensordomäne vieler bakterieller Sensorhistidinkinase besitzen PAS-Domänen. Diese wurden zuerst in den Proteinen PER (period clock protein) aus *Drosophila*, ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) aus Vertebraten und SIM (single-minded protein) aus *Drosophila* gefunden. PAS-Domänen haben eine regulatorische oder sensorische Funktion und können geänderte Lichtverhältnisse, Redoxpotentiale, Sauerstoff und kleine Liganden abhängig von den jeweiligen Cofaktoren detektieren. Es sind auch Sensordomänen mit mehreren PAS-Domänen bekannt (Taylor und Zhulin 1999). Kinasedomänen bestehen aus der DHp-Domäne (Dimerization and Histidine phosphotransfer) und der CA-Domäne (Catalytic and ATP-Binding). Die DHp-Domäne vermittelt die für die Autophosphorylierung wichtige Dimerisierung der Sensorkinase. Der zu phosphorylierende konservierte Histidinrest liegt in der H-Box, einer der fünf Boxen der Kinasedomäne. Die N-, G1-, F- und G2-Box bilden die Bindetasche für ATP in der CA-Domäne (Stock *et al.*, 1989; Parkinson und Kofoed 1992;

Alex und Simon 1994). An Hand von konservierten Aminosäuren in der DHp- und der CA-Domäne werden Sensorhistidinkinasen in die fünf Subfamilien HisKA (Pfam: PF00512), HisKA_2 (Pfam: PF07568), HisKA_3 (Pfam: PF07730), His_Kinase (Pfam: PF06580) und HWE eingeteilt (Pfam: PF07536) (Grebe und Stock 1999; Finn *et al.*, 2010).

Antwortregulatoren bestehen aus einer konservierten N-terminalen regulatorischen Domäne und einer variablen C-terminalen Effektordomäne. In der regulatorischen Domäne liegt der konservierte Aspartatrest, der phosphoryliert wird. Die Effektordomäne enthält bei Antwortregulatoren, die als Transkriptionsfaktor funktionieren, das DNA-Bindemotiv (Stock *et al.*, 2000). Sie kann aber auch wie in CheB enzymatische Funktion haben (Simms *et al.*, 1985) oder wie im Antwortregulator CheY komplett fehlen (Welch *et al.*, 1993).

2.2 Regulation der anaeroben Atmung

Bakterien können auf unterschiedlichen Wegen Energie durch Atmung konservieren. Die Verfügbarkeit von Sauerstoff für die Energiekonservierung ist dabei von entscheidender Bedeutung. Sauerstoff dient als terminaler Elektronenakzeptor der aeroben Atmung. Obligat aerobe Bakterien können nur in Anwesenheit von Sauerstoff wachsen, während Sauerstoff das Wachstum von obligat anaeroben Bakterien hemmt. Im Gegensatz dazu sind fakultativ anaerobe Bakterien in der Lage, ihren Stoffwechsel an dessen Verfügbarkeit anzupassen und gegebenenfalls alternative terminale Elektronenakzeptoren für die Energiekonservierung zu nutzen. In der anaeroben Atmung können dies z.B. Fumarat, Nitrat, TMAO oder DMSO sein. Die Nutzung dieser alternativen Elektronenakzeptoren wird hierarchisch reguliert, sodass der Stoffwechsel mit der größtmöglichen ATP-Ausbeute zumeist favorisiert wird. Elektronenakzeptoren mit einem höheren Redoxpotential z. B. Sauerstoff ($E_0' = +0,8 \text{ V}$) hemmen die Nutzung von Elektronenakzeptoren mit einem niedrigeren Redoxpotential z. B. Nitrat ($E_0' = +0,42 \text{ V}$), sowie die Fermentation (Gunsalus 1992; Unden und Bongaerts 1997).

Die Detektion von Sauerstoff erfolgt über Sauerstoffsensoren, die entweder direkt mit Sauerstoff über Cofaktoren, z.B. Häme, FeS-Cluster oder Cysteinthiolen oder indirekt mit Metaboliten des aeroben Stoffwechsels reagieren (Unden *et al.*, 1995; Georgellis *et al.*, 2001; Green und Paget 2004; McLaughlin *et al.*, 2010). In *E. coli* regulieren verschiedene Sensoren die Gene der anaeroben Atmung (Unden und Bongaerts 1997). Der direkte Sauerstoffsensor FNR (Fumarat-Nitrat-Regulator) wird als Einkomponentensystem nicht

phosphoryliert, sondern seine Funktion als Transkriptionsfaktor wird über die Koordinierung eines FeS-Clusters an vier Cysteinresten (C20, C23, C29 und C122) kontrolliert. Im aktiven (anaeroben) Zustand aktiviert FNR die Gene der anaeroben Atmung und hemmt die Gene der aeroben Atmung.

Zusätzlich zur Verfügbarkeit des bevorzugten Elektronenakzeptors Sauerstoff werden auch alternative Elektronenakzeptoren durch ZKS detektiert und die Genexpression entsprechend reguliert. Beispiele für solche ZKS in *E. coli* sind DcuSR für Fumarat (Zientz *et al.*, 1998) und NarXL für Nitrat (Stewart 1993; Stewart und Rabin 1995). Bei Anwesenheit von Nitrat wird der Nitratsensor NarX autophosphoryliert und der Phosphorylrest auf den Antwortregulator NarL übertragen, der als Transkriptionsfaktor die Gene der anaeroben Nitratatmung aktiviert und die Gene der anaeroben Fumaratatmung und die Fermentation hemmt. Die Gene der aeroben und anaeroben Atmung können auf diese Weise nicht nur durch einen Sensor bzw. Stimulus, sondern durch eine Kombination reguliert werden (Lin und Iuchi 1991; Iuchi und Lin 1993; Unden *et al.*, 1995). Durch die Kombination der Sauerstoff- und Nitratdetektion passt *E. coli* seinen Stoffwechsel an die Verfügbarkeit des terminalen Elektronenakzeptors mit der größtmöglichen ATP-Ausbeute an.

Während in *E. coli* Sauerstoff und Nitrat über voneinander unabhängigen Systemen detektiert werden, erfolgt deren Detektion in *Staphylococcus carnosus* durch ein System: das NreABC-System (Fedtke *et al.*, 2002; Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014).

2.3 Regulation der anaeroben Nitratatmung von *S. carnosus* durch NreABC

S. carnosus wird traditionell in der Lebensmittelindustrie bei der Rohwurstfermentation eingesetzt, aber auch als Modellorganismus für die Erforschung von Pathogenitätsfaktoren anderer Staphylokokken-Spezies und als Stamm für die Produktion biotechnologisch relevanter Proteine (Schleifer und Fischer 1982; Rosenstein *et al.*, 2009; Löfblom *et al.*, 2017). In der Rohwurstfermentation wird *S. carnosus* als Starterkultur verwendet. Unter Sauerstoffabschluss bildet *S. carnosus* bei Anwesenheit von Nitrat Nitrit. Während der Fermentation reagiert das gebildete Nitrit mit dem Myoglobin des Fleisches zu Nitrosomyoglobin. Dies führt zur Ausbildung der typischen Rotfärbung der Wurst. Damit einher geht die Haltbarmachung der Wurst durch Absenkung des pH-Wertes, die Ausbildung

des charakteristischen Geschmacks sowie einer Verdrängung möglicher pathogener Mikroorganismen (Schleifer und Fischer 1982; Rosenstein *et al.*, 2009).

Als fakultativ anaerobes Bakterium kann *S. carnosus* durch die aerobe Atmung mit Sauerstoff oder durch die anaerobe Atmung mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor Energie konservieren (Schleifer und Fischer, 1982; Fedtke *et al.*, 2002; Rosenstein *et al.*, 2009). Die Regulation der anaeroben Nitratatmung erfolgt durch NreABC (Fedtke *et al.*, 2002; Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). Nitrat wird in der anaeroben Nitratatmung über Nitrit zu Ammonium reduziert (Abb. 1): Nitrat wird über den membranständigen Nitrattransporter NarT in die Zelle transportiert. Das aufgenommene Nitrat wird durch die membranständige Nitratreduktase NarGHI zu Nitrit reduziert. Das gebildete Nitrit wird zuerst wieder aus der Zelle transportiert. Sobald das verfügbare Nitrat komplett reduziert wurde, wird Nitrit wieder in die Zelle aufgenommen und durch die cytoplasmatische Nitritreduktase zu Ammonium reduziert (Neubauer und Götz 1996; Pantel *et al.*, 1998; Neubauer und Götz 1999; Fedtke *et al.*, 2002).

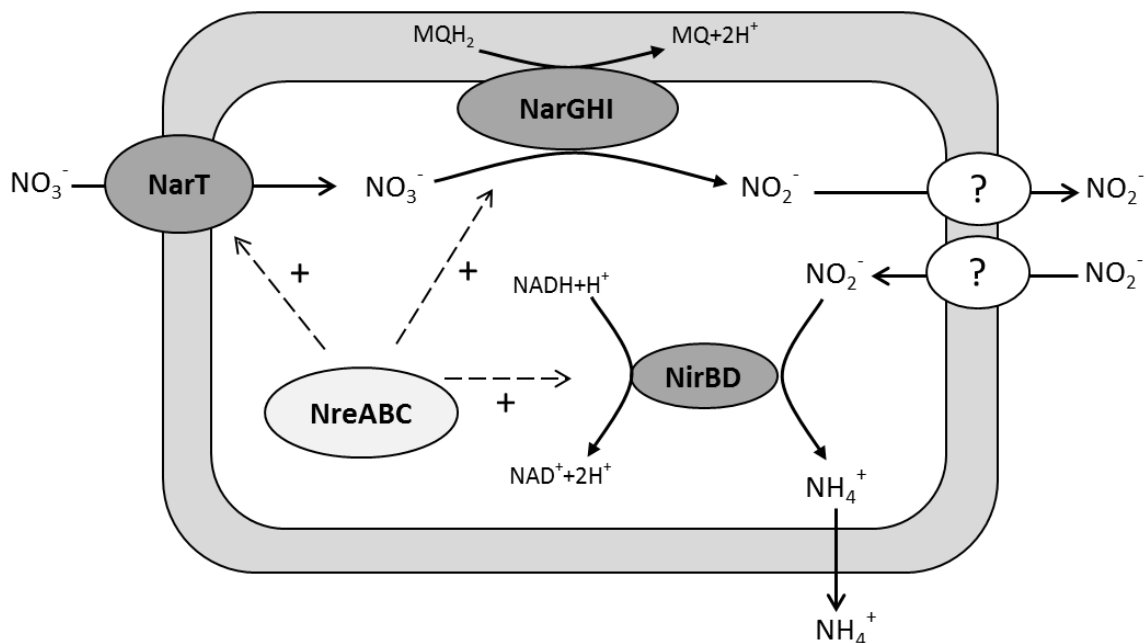


Abb. 1: **Regulation der anaeroben Nitratatmung:** Nitrat wird aus dem Milieu durch die membranständige Nitratreduktase (NarT) in die Zelle aufgenommen. Durch die membranständige Nitratreduktase (NarGHI) wird Nitrat zu Nitrit reduziert. Dabei wird Menachinol (MQH₂) zu Menachinon (MQ) oxidiert und es entstehen zwei Protonen. Das toxische Nitrit wird wieder aus der Zelle transportiert. Nach der vollständigen Reduktion von Nitrat wird Nitrit wieder aufgenommen und durch die cytoplasmatische Nitritreduktase (NirBD) unter Oxidation von NADH+H⁺ zu NAD⁺+2H⁺ zu Ammonium reduziert. Die regulatorischen Proteine NreABC regulieren die Genexpression der an der Nitratatmung beteiligten Proteine.

Die Gene der an der Nitratatmung beteiligten Proteine befinden sich an einem Genlocus. Die Gene der Nitritreduktase und der Nitratreduktase liegen jeweils in einem Operon. Zwischen dem Operon der Nitratreduktase und dem Gen des Nitrattransporters liegt das *nreABC*-Operon (Fast *et al.*, 1997; Pantel *et al.*, 1998; Neubauer *et al.*, 1999; Fedtke *et al.*, 2002). Die Expression der Nitratreduktase und der Nitritreduktase wird durch Sauerstoff gehemmt und durch Anaerobiose induziert. Nitrat und Nitrit induzieren ebenfalls die Expression der Nitratreduktase, hemmen aber die Nitritreduktase. (Neubauer und Götz 1996; Pantel *et al.*, 1998). Der Nitrattransporter wird durch Anaerobiose und Nitrat induziert (Fast *et al.*, 1997). In *E. coli* erfolgt die Regulation der anaeroben Nitratatmung durch die unabhängigen Systeme FNR, ArcBA und NarXL. In *S. carnosus* erfolgt die Regulation durch das Sauerstoffsensitive ZKS NreBC zusammen mit dem Nitratsensor NreA (Fedtke *et al.*, 2002; Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). Die Gene der drei Proteine finden sich im *nre*-Operon (nitrogen regulation) zwischen den Genen der Nitratreduktase *narGHJ* und dem *narT*-Gen des Nitrattransporters. NreBC stellt ein klassisches ZKS dar mit NreB als Sensorhistidinkinase und NreC als Antwortregulator (Fedtke *et al.*, 2002) (Abb. 2).

NreB besteht aus einer N-terminalen sensorischen PAS-Domäne und einer C-terminalen Kinasedomäne der Subfamilie HisKA_3 (Müllner *et al.*, 2008). Die PAS-Domäne enthält das sensorische Sauerstoff-labile $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -Cluster, welches über die vier konservierten Cysteinreste C59, C62, C74 und C77 koordiniert wird. Unter Sauerstoffeinfluss degradiert das $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -Cluster mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 5$ min über ein $[2\text{Fe}2\text{S}]^{2+}$ -Cluster zum ungebundenen $\gamma\text{-FeOOH}$ (Kamps *et al.*, 2004; Müllner *et al.*, 2008; Reinhart *et al.*, 2010). Beide Formen von NreB mit dem $[2\text{Fe}2\text{S}]^{2+}$ -Cluster und dem FeS-freien apoNreB sind inaktiv (Müllner *et al.*, 2008). Die Degradation des $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -Cluster korreliert mit der Abnahme der Phosphorylierungsaktivität von NreB *in vitro* (Nilkens *et al.*, 2014). In der H-Box der PAS-Domäne befindet sich der konservierte Histidinrest H159. Aufgrund seiner Lage und seiner Konservierung handelt es sich bei diesem Rest um die hypothetische Phosphorylierungsstelle von NreB (Fedtke *et al.*, 2002). Unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus liegt NreB als ein permanentes Dimer vor (Müllner *et al.*, 2008). Nach der Autophosphorylierung des konservierten Histidinrests wird der Phosphorylrest von NreB auf den konservierten Aspartatrest D53 von NreC übertragen (Fedtke *et al.*, 2002; Nilkens *et al.*, 2014) (Abb. 2).

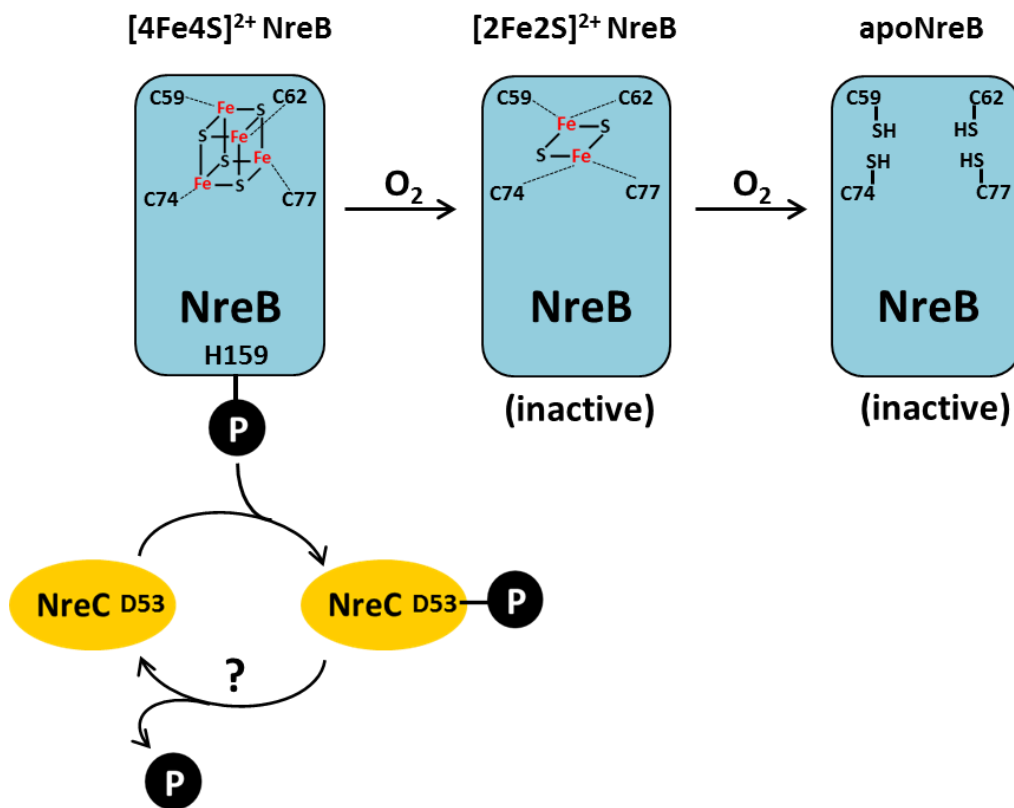


Abb. 2: **Das NreBC-Zweikomponentensystem:** NreB koordiniert unter anaeroben Bedingungen ein [4Fe4S]²⁺-Cluster, welches unter Sauerstoffeinfluss degradiert und NreB in seine inaktiven Formen überführt. [4Fe4S]²⁺ NreB autophosphoryliert an dem konservierten Histidinrest H159. Der Phosphorylrest wird auf den konservierten Aspartatrest D53 des Antwortregulators NreC übertragen, wodurch NreC aktiviert wird. Durch einen noch nicht bekannten Mechanismus erfolgt die Dephosphorylierung von NreC.

Als Transkriptionsfaktor bindet phosphoryliertes NreC (NreC-P) mittels eines Helix-Turn-Helix-Motivs vom LuxR-Typ an palindromische, GC-reiche Sequenzen der Promotoren der Nitratreduktase, der Nitritreduktase und des Nitrattransporters. Diese Bindestelle findet sich bei -35 und bei Position -60 bis -70 im Fall der Nitratreduktase und des Nitrattransporters. Im Promotor der Nitritreduktase fehlt die Bindestelle im Bereich von -35. Diese befindet sich stattdessen im Bereich von -90. Dies lässt auf einen zusätzlichen Regulationsmechanismus unabhängig von NreBC schließen (Fedtke *et al.*, 2002).

Während die Sauerstoff-abhängige Genexpression über das NreBC-ZKS reguliert wird, wurde das dritte Protein des Operons, NreA, als Nitratsensor identifiziert (Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). NreA moduliert Nitrat-abhängig die NreB-Aktivität: Ohne Nitrat interagiert NreA in seiner dimeren Form mit NreB, dessen Phosphorylierungsaktivität dadurch gesenkt wird. Ob NreA einen Einfluss auf die Kinase- und/oder Phosphataseaktivität

von NreB hat, ist unklar. NreA bindet Nitrat und liegt dann als Monomer vor. Dadurch wird die Interaktion mit NreB geschwächt. Dies führt zu einer maximalen Aktivierung der Genexpression der Nitratreduktase im *narG-lip* Reporter-genassay (Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). NreA besteht nur aus einer GAF-Domäne (cGMP-spezifische Phosphodiesterase, Adenylzyklase, Transkriptionsfaktor FhIA), über die Nitrat gebunden wird (Fedtke *et al.*, 2002; Niemann *et al.*, 2014).

Der Sauerstoffsensor NreB und der Nitratsensor NreA bilden einen gemeinsamen Sensorkomplex, der die zwei unabhängigen Stimuli Sauerstoff und Nitrat zu einem gemeinsamen Signal in Form der Phosphorylierung des Antwortregulators NreC vereint. Die Expression der Gene der anaeroben Nitratatmung wird in *S. carnosus* durch ein System Sauerstoff- und Nitrat-abhängig moduliert (Fedtke *et al.*, 2002; Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014) (Abb. 3), während in *E. coli* voneinander unabhängige Sensorsysteme Sauerstoff und Nitrat erkennen und dann die Genexpression steuern (Iuchi und Lin 1993; Unden und Bongaerts 1997).

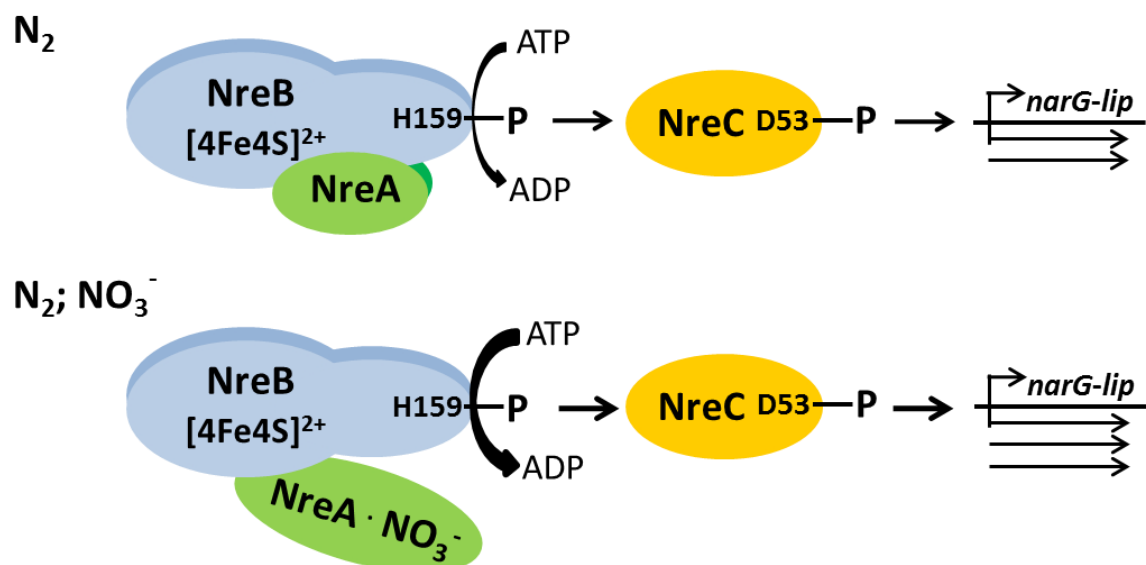


Abb. 3: **Der NreAB-Sensorkomplex:** Der Nitratsensor NreA und der Sauerstoffsensor NreB interagieren unter anaeroben Bedingungen und bilden einen gemeinsamen Sensorkomplex. In Abhängigkeit von Nitrat wird die Autophosphorylierung von NreB moduliert, was zu einer unterschiedlich starken Expression der Zielgene (hier dargestellt durch die Reporter-genfusion *narG-lip*) führt. Verändert nach Nilkens *et al.*, 2014.

2.4 Kontrolle der Aktivität von Antwortregulatoren

Neben der Aktivierung der Antwortregulatoren mittels Phosphorylierung durch die Kinase ist die Dephosphorylierung der Antwortregulatoren von entscheidender Bedeutung für den Funktionszustand der ZKS. Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem Antwortregulator gewährleistet (West und Stock 2001; Gao und Stock 2009). Durch die Dephosphorylierungsreaktion werden Störeffekte durch eine unspezifische Phosphorylierung in Abwesenheit des spezifischen Stimulus beseitigt. Für die Dephosphorylierung existieren verschiedenen Mechanismen (Stock *et al.*, 1989; Huynh und Stewart 2011) (Abb. 4). Antwortregulatoren besitzen eine intrinsische Autophosphataseaktivität, die mit Halbwertszeiten von wenigen Sekunden bis Stunden zur Dephosphorylierung des Proteins führt (Stock *et al.*, 1989; Bourret 2010) (Abb. 4A). Durch ein nukleophiles H₂O-Molekül erfolgt die Hydrolyse des Acylphosphats am konservierten Aspartatrest (Wolanin *et al.*, 2003). Durch unterschiedliche Zugänglichkeiten des nukleophilen H₂O zur Acylphosphatverbindung ergeben sich die unterschiedlichen Halbwertszeiten (Pazy *et al.*, 2010). Essentiell für die Autophosphatasereaktion sind das zweiwertige Kation Mg²⁺ (Lukat *et al.*, 1990) und ein konservierter Lysinrest; Varianten des Lysinrests führen zu einer verringerten Phosphataseaktivität (Lukat *et al.*, 1991; Pioszak und Ninfa 2004).

Viele Sensoren der ZKS wirken zudem bifunktional sowohl als Kinase, wie auch als Phosphatase durch die Dephosphorylierung des spezifischen Antwortregulators (Ninfa und Magasanik 1986; Keener und Kustu 1988; Igo *et al.*, 1989; Gao und Stock 2009) (Abb. 4C). Für die Phosphataseaktivität ist die DHp-Domäne wichtig (Jiang *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000; Carmany *et al.*, 2003). Durch die bifunktionale Aktivität wird ein Gleichgewicht zwischen phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem Antwortregulator gewährleistet und einer unspezifischen Phosphorylierung wird entgegengewirkt (West und Stock 2001; Gao und Stock 2009). Die Kinase- und Phosphataseaktivität wird daher streng reguliert (Russo und Silhavy 1991; Bornhorst und Falke 2003). Dies geschieht durch Konformitätsänderungen (Pratt und Silhavy 1995; Albanesi *et al.*, 2009; Casino *et al.*, 2009), durch weitere Regulatoren (Pioszak und Ninfa 2003b; Jiang und Ninfa 2009; Buelow und Raivio 2010) oder stimulusabhängig (Albanesi *et al.*, 2009; Möglich *et al.*, 2009a; Stewart und Chen 2010). Die stimulusabhängige Regulation kann positiv oder negativ sein (William und Stewart 1997; Chamnongpol *et al.*, 2003). In manchen Sensoren wird nur die Kinase oder Phosphatase

reguliert, die andere Aktivität ist konstitutiv (Stock *et al.*, 2000; Gao und Stock 2009; Stewart 2010). Während durch die Kinaseaktivität der bifunktionalen Sensoren auch nichtspezifische Antwortregulatoren phosphoryliert werden können, ist die Phosphataseaktivität spezifisch für den eigenen Antwortregulator. In *Corynebacterium glutamicum* vermitteln die homologen ZKS HrrSA und ChrSA die Spezifität im Häm-Homöostasestoffwechsel (Hentschel *et al.*, 2014). HrrSA reguliert die Verwertung von Häm als alternative Eisenquelle (Frunzke *et al.*, 2011) und ChrSA bewirkt die Häm-Toleranz bei toxischen Häm-Level (Heyer *et al.*, 2012). Die Sensorhistidinkinasen HrrS und ChrS phosphorylieren jeweils beide Antwortregulatoren HrrA und ChrA, können aber nur ihren jeweiligen Antwortregulator dephosphorylieren (Hentschel *et al.*, 2014). Die Phosphatasereaktion setzt eine starke Interaktion zwischen Sensor und Antwortregulator voraus, wodurch sich die Spezifität erklärt (Siraporn *et al.*, 2010).

Des Weiteren kann die Dephosphorylierung von Antwortregulatoren auch durch weitere Proteine katalysiert werden. Diese Hilfsproteine können die Dephosphorylierung der Antwortregulatoren durch weitere Proteine unterstützen oder auch selber als Phosphatasen wirken (Ninfa und Magasanik 1986; Hess *et al.*, 1988). Beispiele für solche Hilfsphosphatasen sind CheZ und CheX (Abb. 4B). In *E. coli* katalysieren sie die Dephosphorylierung des Antwortregulator CheY der Chemotaxis (Silversmith 2010). Beide Phosphatasen dephosphorylieren CheY-P mit einem identischen Mechanismus. Daran beteiligt sind die konservierten Aminosäurereste Glutamin, Asparagin oder Aspartat (Silversmith 2010). Die Amid-haltige Seitenkette des Glutamins oder Asparagins ist für die Orientierung des nukleophilen H₂O-Moleküls zur Acylphosphat-Hydrolyse wichtig, die saure Seitenkette von Aspartat (oder Glutamat) interagiert mit dem konservierten Lysin des Antwortregulators (Zhao *et al.*, 2002; Pazy *et al.*, 2010). Die Hilfsphosphatasen in der Sporulation von *Bacillus* katalysieren die jeweilige Phosphatasereaktion durch unterschiedliche Mechanismen. In RapH erfolgt die Dephosphorylierung von Spo0F vermutlich nur durch einen Glutaminrest ohne die weitere Beteiligung eines sauren Rests (Parashar *et al.*, 2011). In Spo0E katalysiert ein Aspartatrest die Phosphatasereaktion und ein Glutaminrest stabilisiert die Interaktion mit Spo0A (Diaz *et al.*, 2008).

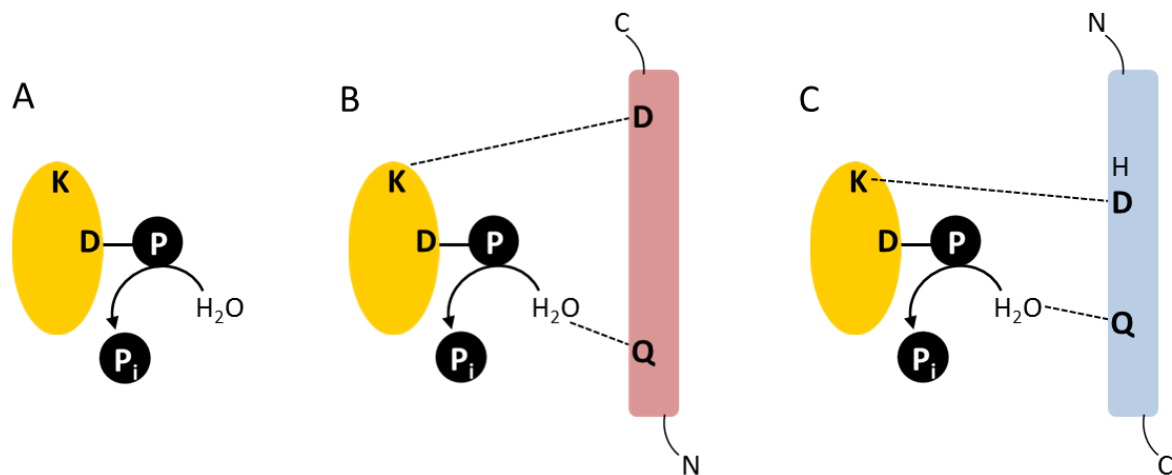


Abb. 4: **Mechanismen der Dephosphorylierung von Antwortregulatoren:** Antwortregulatoren (orange) können durch verschiedene Mechanismen dephosphoryliert werden. A: Antwortregulatoren besitzen eine intrinsische Autophosphataseaktivität, die die Hydrolyse mittels nukleophilen H_2O -Moleküls katalysiert. B: Hilfsphosphatasen (z.B. CheZ, lila) katalysieren die Dephosphorylierung, besitzen jedoch keine Kinaseaktivität. Der konservierte Glutaminrest orientiert das nukleophile H_2O -Molekül für die Hydrolyse. Der konservierte Aspartatrest formt eine Salzbrücke mit dem konservierten Lysinrest des Antwortregulators. C: Für Sensorhistidinkinasen der Subfamilie HisKA_3 (z.B. NarX, blau) wird ein ähnlicher Mechanismus für die Dephosphorylierung von Antwortregulatoren angenommen, da sie ebenso einen konservierten Aspartat- und Glutaminrest besitzen. Verändert nach Huynh und Stewart 2011.

2.5 Das DxxxQ-Phosphatasemotiv

Die essentiellen Aminosäuren für die Dephosphorylierung von Antwortregulatoren durch Hilfsphosphatasen sind ein konservierter Glutamin-, Asparagin- und Aspartatrest. In den Hilfsphosphatasen CheZ bzw. CheX sind diese im DxxxQ- bzw. ExxN-Motiv lokalisiert (Zhao *et al.*, 2002; Silversmith 2010; Huynh und Stewart 2011). Diese Motive finden sich auch in der $\alpha 1$ -Helix der DHp-Domäne von Sensorhistidinkinasen unmittelbar folgend auf den konservierten Histidinrest, der autophosphoryliert wird. In Sensorhistidinkinasen der Subfamilie HisKA_3 handelt es sich um ein DxxxQ-Motiv (Abb. 4C; Huynh *et al.*, 2010). In 30 % der untersuchten Proteine ist der konservierte Glutaminrest durch einen Histidinrest ersetzt (Huynh *et al.*, 2010; Sheeler *et al.*, 2005). Sensorhistidinkinasen der Subfamilie HisKA besitzen ein E/DxxT/N-Motiv (Huynh *et al.*, 2010). Es wurde daher angenommen, dass die Phosphatasereaktionen in den Hilfsphosphatasen und den bifunktionalen Sensoren auf einem konservierten Mechanismus beruhen. Die Funktionen der konservierten Aminosäuren wurden in verschiedenen Proteinen untersucht, wobei sie mit der Kinase- und/oder Phosphataseaktivität des jeweiligen Proteins im Zusammenhang stehen (Huynh *et al.*, 2010; Willett und Kirby 2012; Jeong *et al.*, 2012; Hentschel *et al.*, 2014). In NarX (HisKA_3, DxxxQ)

von *E. coli* ist der Aspartatrester NarX(D400) sowohl für die Kinaseaktivität wie auch für die Phosphataseaktivität wichtig; der Glutaminrester NarX(Q404) spielt eine wesentliche Rolle für die Phosphataseaktivität (Huynh *et al.*, 2010).

2.6 Ziele der Arbeit

Das DxxxQ-Motiv von Sensorhistidinkinasen der Subfamilie HisKA_3 ist wichtig für die Regulation des Levels an phosphoryliertem Antwortregulator (Huynh *et al.*, 2010; Huynh und Stewart 2011). Bei dem Sauerstoffsensor NreB aus *S. carnosus* handelt es sich ebenfalls um eine HisKA_3-Sensorhistidinkinase. Daher sollte zuerst untersucht werden, ob NreB ebenfalls ein DxxxQ-Motiv besitzt. Um dessen Rolle in der Regulation der NreC-Aktivität zu untersuchen, sollten Varianten des konservierten Aspartatresters und Glutaminrests erstellt und getestet werden. Der Fokus lag dabei bei der *in vivo* Regulation der Genexpression, dem Wachstum und bei *in vitro* Phosphorylierungsstudien.

Zusätzliche Aspekte waren die Untersuchung des konservierten Histidinrests H159 als Phosphorylierungsstelle und die *in vitro* und *in vivo* Aktivität des Antwortregulators NreC. Dabei sollte untersucht werden, ob NreC, wie für andere Antwortregulatoren bekannt, auch unabhängig von NreB phosphoryliert und aktiviert werden kann und welche Rolle dies in der *in vivo* Funktion hat. NreC sollte *in vitro* mittels Carbamoylphosphat phosphoryliert werden. Als Nachweisreagenz sollte der Phospho-affine Phos-tag dienen. Diese Nachweismöglichkeit phosphorylierter Proteine stellt eine Alternative zu der Phosphorylierung mittels radioaktiv markiertem ATP dar.

3. Material und Methode

3.1 Stämme und Plasmide

3.1.1 Stämme und Plasmide in *E. coli*

Stamm	Genotyp	Referenz
JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thiΔ(lac-proAB), F'[traD36 proAB⁺, lacI^qlacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, <i>F' hsdS gal1</i> DE3, IPTG-induzierbar	Studier und Moffat 1986
XL1-Blue	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi-1 lac [F' proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene
XL10-Gold	<i>Tet^RΔ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy cam^R]</i>	Stratagene
M15	[pREP4], <i>F</i> ⁻ , <i>Φ80ΔlacM15, thi, lac⁻, mtl⁻, recA⁺, kan^R</i>	Qiagen

Plasmid	Genotyp	Referenz
pMW2242	pRB473 mit <i>xylRA-nreB-his₆</i> (aus pCQE1nreB)	diese Arbeit
pMW1617	pASK-IBA3plus- <i>nreC, amp^R</i>	Nilkens <i>et al.</i> , 2014
pMW2423	pMW1617 aber <i>NreC(D53A)</i>	diese Arbeit
pETArcA-1	<i>arcA</i> in pET28a(+), zur Überproduktion von His ₆ -ArcA	Strohmaier <i>et al.</i> , 1998
pQE31nreA	His ₆ -NreA, <i>kan^R, amp^R</i> , IPTG-induzierbar	Schlag 2008

3.1.2 Stämme und Plasmide von *S. carnosus*

Stamm	Genotyp	Referenz
m1	<i>nreABC::ermBR</i>	Fedtke <i>et al.</i> , 2002

Plasmid	Genotyp	Referenz
pCQE1nreB	pCQE1 Derivat mit <i>nreB-his₆, xylA</i> -Promoter (Xylose-induzierbar und Glukose-reprimierbar), <i>cam^R</i>	Fedtke <i>et al.</i> , 2002
pRB473	<i>E. coli/S. carnosus</i> Shuttle-Vektor (<i>amp^R</i> in <i>E. coli/cam^R</i> in <i>S. carnosus</i>)	Brückner 1992
pMW418	pRB473 mit <i>nreABC</i> und nativem Promotor	Müllner <i>et al.</i> , 2008
pMW2419	pMW418 aber <i>NreB(H159Q)</i>	diese Arbeit
pMW2417	pMW418 aber <i>NreB(D160A)</i>	diese Arbeit
pMW2421	pMW418 aber <i>NreB(D160S)</i>	diese Arbeit
pMW2422	pMW418 aber <i>NreB(Q164A)</i>	diese Arbeit
pMW2418	pMW418 aber <i>NreB(Q164H)</i>	diese Arbeit
pMW2420	pMW418 aber <i>NreB(Q164E)</i>	diese Arbeit
pMW1040	pMW418 mit <i>narG-lip</i> Reportergenfusion	Nilkens <i>et al.</i> , 2014
pMW1001	pPS44 mit <i>narG</i> -Promotor	Nilkens <i>et al.</i> , 2014
pMW2544	pMW1040 aber <i>ΔnreAB</i>	diese Arbeit

pMW2342	pMW1040 aber NreB(H159Q)	diese Arbeit
pMW2343	pMW1040 aber NreB(D160A)	diese Arbeit
pMW2333	pMW1040 aber NreB(D160S)	diese Arbeit
pMW2331	pMW1040 aber NreB(Q164A)	diese Arbeit
pMW2241	pMW1040 aber NreB(Q164H)	diese Arbeit
pMW2332	pMW1040 aber NreB(Q164E)	diese Arbeit
pMW2425	pMW2242 aber NreB(D160A)	diese Arbeit
pMW2426	pMW2242 aber NreB(D160S)	diese Arbeit
pMW2405	pMW2242 aber NreB(Q164A)	diese Arbeit
pMW2243	pMW2242 aber NreB(Q164H)	diese Arbeit
pMW2424	pMW2242 aber NreB(Q164E)	diese Arbeit

3.1.3 Stammhaltung

Nach Überprüfung der Plasmid-DNA mittels Sequenzierung wurden die Stämme für die langfristige Lagerung in die Stammhaltung aufgenommen. Sie wurden mit 1 mL Medium und 1 mL sterilem 50 %-igem Glycerin (v/v) gemischt und in Aliquots zu je 1 mL bei -80 °C gelagert. Für die folgend beschriebenen Zuchten wurden die Stämme aus der Stammhaltung auf Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum vereinzelt.

3.2 Medien und Zuchten

Alle **Medien und Zusätze** für die Zucht der Bakterien wurden steril verwendet. Sie wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert (0,45 µm). Sofern nicht anders angegeben wurden sie in H₂O_{dest} angesetzt. Alle sonstigen Materialien und Gefäße wurden ebenfalls steril verwendet und entweder durch Autoklavieren oder durch trockene Hitze sterilisiert.

Stämme von *E. coli* wurden in LB-Medium (nach Sambrook und Russell 2001: 10 g/L Trypton/Pepton aus Casein; 5 g/L Hefeextrakt und 5 g/L NaCl) und Stämme von *S. carnosus* in BM-Medium (nach Götz und Schumacher 1987: LB-Medium mit zusätzlich 1 g/L Glucose und 1 g/L Na₂HPO₄) gezüchtet. Für Agarplatten wurde dem jeweiligen Medium 15 g/L Agar-Agar (Kobe I) zugesetzt.

Die verwendeten **Antibiotika** wurden sterilfiltriert und sofern nicht anders angegeben in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 100 µg/mL Ampicillin, 20 µg/mL Chloramphenicol, 2,5 µg/mL Erythromycin und 50 µg/mL Kanamycin. Bei gleichzeitiger Verwendung von zwei Antibiotika wurde deren Endkonzentration jeweils halbiert. Erythromycin und Chloramphenicol wurden in EtOH_{abs.} angesetzt.

Induktoren für die Protein-Überexpression wurden ebenfalls sterilfiltriert. AHT wurde in DMF gelöst.

Für die Zuchten wurden für jede HK zuvor eine VK mit einer Einzelkolonie beimpft. Sofern nicht anders angegeben waren die Medien und Zusätze von VK und HK identisch. Aerobe VK wurden über Nacht in 5 mL Medium bei 37° C und 180 rpm im Schüttelinkubator gezüchtet. Anaerobe VK wurden als semianaerobe Standkultur in 10 mL Medium bei 37° C gezüchtet. Für die anaerobe NreB-Überproduktion wurden 5-10 VK a 50 mL Hefeextrakt-Medium in Schikanekolben bei 37° C und 180 rpm im Schüttelinkubator für 24 h bis zu einer OD₅₇₈ > 30 gezüchtet.

Für die **Reportergenstudien** wurde *S. carnosus* in BML-Medium (nach Nilkens *et al.*, 2014: LB-Medium mit 1 g/L Glukose) gezüchtet. Die VK wurde vor dem Beimpfen der HK pelletiert (10.000 rpm; 10 min; RT; Eppendorf mini-Spin plus) und in 5 mL (aerob) oder 1 mL (anaerob) resuspendiert, um bereits gebildete Lipase zu entfernen. Die 40 mL HK wurde auf eine OD₅₇₈ von 0,1 beimpft. Die Zucht erfolgte in Schikanekolben (300 mL, aerob) im Schüttelinkubator oder in Müller-Krempel-Flaschen (125 mL, anaerob) als Standkultur im Wasserbad. Die Müller-Krempel-Flaschen wurden mit einem Gummistopfen und einer Metallkrempe luftdicht verschlossen. Aus dem inokulierten Medium für die anaerobe Zucht wurde der Sauerstoff durch mehrmaliges Anaerobisieren (3x 15 min) und Begasen mit Stickstoff evakuiert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 wurde 1 mL zellfreier Überstand aus der Kultur entnommen und bis zur Messung der Lipaseaktivität bei 4 °C gelagert. Die Entnahme der Proben aus den Müller-Krempel-Flaschen erfolgte anaerob mittels steriler Kanüle und 1 mL-Spritze. Dem Medium der VK und HK wurde Chloramphenicol und optional 10 mM NaNO₃ zugegeben.

Die aeroben und anaeroben Zuchten zur **Messung des Wachstums** von *S. carnosus* erfolgten analog wie für den Lipasetest beschrieben in BM-Medium. Für die Nitritbestimmung wurden zellfreie Proben entnommen und bei 4 °C gelagert.

Die Verdopplungszeit t_d der einzelnen Stämme wurde wie folgt berechnet:

$$\mu = \frac{\ln(X_{t1}) - \ln(X_{t0})}{t1 - t0}$$

$$td = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

μ = Wachstumskonstante

X_{t_1} = Zelldichte zum Zeitpunkt t_1

X_{t_0} = Zelldichte zum Zeitpunkt t_0

t_1 = Endzeitpunkt des gewählten Wachstumsintervall

t_0 = Anfangszeitpunkt des gewählten Wachstumsintervall

Die Zucht für die **anaerobe NreB-Überproduktion** erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Müllner (2008). Die Stämme wurden auf Cam-haltigem BM-Agar für 24-36 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um eine hohe Zelldichte zu erreichen erfolgte die anschließende Zucht in Hefeextrakt-Medium (nach Kempf *et al.*, 1999: 45 g/L Hefeextrakt; 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 40 mM Glycerin; 10 mM NaNO₃; 10 mM Ammoniumeisen(III)citrat und 1 mM Cysteinhydrochlorid). NaNO₃, Ammoniumeisen(III)citrat und Cysteinhydrochlorid wurden nur der HK zugegeben. 3,2 L Cam-haltiges Hefeextrakt-Medium wurde aus den Vorkulturen auf eine OD₅₇₈ von 2-4 angeimpft und inkubiert (37 °C; 180 rpm). Bei einer OD₅₇₈ ≥ 10 wurde die NreB-His₆-Überproduktion durch Zugabe von 33 mM Xylose für 6 h induziert. Die Kulturen wurden auf vier Müller-Krempel-Flaschen (1 L) verteilt und mit frischem Hefeextrakt-Medium aufgefüllt. Mit Gummistopfen und Metallkrempe luftdicht verschlossen wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C auf dem Magnetrührer (300 rpm) leicht rührend inkubiert. Im Anaerobenzelt (Coy; Formiergas (95 % N₂, 5 % H₂)) wurden die Zellen in Zentrifugenbecher (500 mL) gefüllt, diese mit einem Deckel mit Gummidichtung luftdicht verschlossen und außerhalb des Zeltes pelletiert (8.000 rpm; 30 min; 4 °C; Beckman Coulter, Avanti J-E, Rotor JA-10).

Die Zuchten für die **Überexpression in *E. coli*** erfolgten in LB-Medium mit Zusatz der jeweiligen Antibiotika. Folgende Stämme wurden verwendet: pQE31nreA in M15 (His₆-NreA), pETArcA-1 in BL21(DE3) (His₆-ArcA), pMW1617 in JM109 (NreC-Strep) und pMW2423 in JM109 (NreC(D53A)-Strep). Die Medien wurden jeweils auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6-0,8 (His₆-tag Proteine) bzw. 0,5-0,6 (Strep-tag Proteine) inkubiert (37 °C; 180 rpm). Die Überproduktion der Proteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG für 2 h (His₆-ArcA) oder 5 h (His₆-NreA) induziert (QIAexpressionist, Qiagen). Für die Überproduktion von Nitrat-gebundenem His₆-NreA wurde der Kultur zu Beginn der Zucht sowie 1 h und 4 h nach der Induktion je 10 mM NaNO₃ zugegeben (Nilkens *et al.*, 2014). Die

Proteinexpression von Strep-tag Proteinen wurde durch Zugabe von 200 ng/mL Anhydrotetracyclin für 5 h induziert. Nach der Induktion wurden die Zellen pelletiert (8.000 rpm; 15 min; 4 °C; Beckman Coulter, Avanti J-E, Rotor JA-10), bis zur Protein-Isolierung bei -20 °C gelagert oder sofort verwendet.

3.3 Molekulargenetische Methoden

Die beschriebenen molekulargenetischen Methoden basieren auf Sambrook und Russell (2001). Enzyme, ihre jeweiligen Puffer, Agenzien für die PCR und Größenstandards wurden, sofern nicht anders beschrieben, von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen. Für die Plasmid-Isolierung und Reinigung von PCR-Produkten und Ligationsansätzen wurden die Kits von Sigma-Aldrich verwendet. Für die bioinformatische Konstruktion der Plasmide wurde der CloneManager 6.0 verwendet. Primer wurden mittels OligoCalc optimiert und von Eurofins MW oder Sigma-Aldrich erstellt. Die Konzentration von DNA wurde in Mikroliterküvetten und Photometer von Bio-Rad gemessen. Die Reinheit der DNA wurde über die Quotienten 260/280 und 260/230 ermittelt. Die Restriktion der DNA wurde nach den für die verwendeten Restriktionsenzymen spezifischen Protokollen durchgeführt. Bei Verwendung von zwei nicht kompatiblen Restriktionsenzymen wurden die jeweiligen FastDigest-Enzyme verwendet. Sofern nötig, wurden die Vektoren dephosphoryliert. Restringsierte Vektoren wurden durch Gelextraktion gereinigt (GenElute PCR Clean-Up Kit). Ligationen wurden im molekularen Verhältnis Vektor:Insert von 1:3, 1:5, 1:10 oder 1:20 entweder über Nacht bei 16 °C oder für 0,5-2 h bei RT durchgeführt. Vor der weiteren Klonierung wurde die Ligase hitzeinaktiviert (65 °C für 10 min). Die Elektroporation der Plasmide in *E. coli* erfolgte per Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) in elektrokompetente Zellen (Farinha und Kropinski 1990) bzw. für die Mutagenese-PCR per Hitzeschock (Froger und Hall, 2007) in hitzekompetente Bakterien. Die Transformation in *S. carnosus* erfolgte über Elektroporation nach einem veränderten Protokoll von Löfblom *et al.*, 2006 wie in Nilkens *et al.*, 2014 beschrieben. Die Mutagenese-PCR wurde nach dem Protokoll „Site directed Mutagenesis“ (Stratagene) mit komplementären Mutagenese-Primern durchgeführt. Für die PCRs wurden die Polymerasen Phusion High-Fidelity, PfuUltra II Fusion HS (Agilent Technologies) und die LongAmp-Taq (NEB) verwendet. PCR-Produkte und DNA-Restriktionsbandenmuster wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Elektrophorese erfolgte in 1-3 %-igen Agarosegelen

(w/v) in 1x TAE-Puffer (50 x TAE (pH 8,0): 242 g/L Tris; 57,1 mL/L Essigsäure und 100 mL/L EDTA (0,5 M)) im elektrischen Feld (90-120 V). Zum Sichtbarmachen der DNA-Moleküle wurde die Agarose mit dem fluoreszierenden Farbstoff RedSafe (0,25 µL/10 mL Gel; iNtRON Biotechnology) versetzt. Die DNA-Moleküle wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6x Ladepuffer (Thermo Fisher Scientific) gemischt. Die Größe der DNA-Moleküle wurde durch Vergleich mit Längenstandards der Firma Thermo Fisher Scientific bestimmt.

Die Sequenzierung von Plasmiden oder PCR-Produkten wurde durch StarSEQ (Mainz) oder LGC Agowa (Berlin) mit den in Tab. 1 aufgeführten Sequenzierungsprimern durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA wurde gemäß den Angaben der Firmen mit den Sequenzierungsprimern versetzt. Die Auswertung erfolgte mittels Alignment gegen die CloneManager-Sequenzen und Überprüfung der Sequenzierungschromatogramme mit FinchTV.

Tab. 1: **Sequenzierungsprimer:** Diese Primer wurden standardmäßig für Sequenzierungen verwendet. Sofern notwendig, wurden auch die Mutageneseprimer (Tab. 2) benutzt.

Primer	Sequenz (5'→3')	T _M [°C]
pRB473nreABC-F	GATGCCTCAAGCTAGAGAGTC	59,8
37_NreA_I43A_F	GATTGCATAGTGC GGTCGCTAAATGGAAATATG	67
R-C77S-NreB	CTAAGGCTTCTAAAAAGGAGTTTTTCACAAGACATAATATC	81,2
nreC_rev	GTCACATTTTTGCCACAATTCAAC	60,3
F_Seq_SD_nreA	CTAGAGAGTCATTACCCAG	51,8

3.3.1 Plasmid-Isolierung

Plasmide aus *E. coli* wurden mit dem GenElute Plasmid MiniPrep Kit (Sigma-Aldrich) isoliert. Für *S. carnosus* wurde das Protokoll für Gram-positive Bakterien angepasst. Nach Resuspension des Zellpellets wurden die Zellen mit Glasperlen (Ø 0,1 mm) in der FastPrep-Zellmühle (5,5 m/s; 20 s) mechanisch lysiert. Nach Zugabe von Lyse- und Neutralisationspuffer wurden Zelltrümmer und Glasperlen zweimal abzentrifugiert (13.000 rpm; 5 min; RT; Eppendorf mini-Spin plus). Alle weiteren Schritte wurden gemäß Protokoll durchgeführt.

3.3.2 Polymeraseketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde eingesetzt, um Schnittstellen für die Klonierung in Plasmide einzufügen, Plasmid-DNA aus *S. carnosus* für die Sequenzierung zu amplifizieren oder um die DNA

gerichtet zu mutieren, was Aminosäuresubstitutionen im kodierten Protein zur Folge hat. Der Ansatz und das Programm wurden für die jeweils verwendete Polymerase, das DNA-Template und die Primerkombinationen angepasst. Es wurden die Polymerase Phusion High-Fidelity und für große Amplifikate die PfuUltra II Fusion HS (Agilent Technologies; > 10 kb) oder die LongAmp-Taq (NEB) verwendet.

3.3.3 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese wurde nach dem Protokoll „Site directed Mutagenesis“ (Stratagene) durchgeführt. In die Mutagenese-PCR wurde 10 ng DNA als Template eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tab. 2 aufgeführt. Der PCR folgte der *DpnI*-Verdau (1 µL/PCR-Ansatz; 3 h bei 37 °C) und die Hitzeschock-Transformation in XL1-Blue oder XL10-Gold.

Tab. 2: Mutagenese-Primer

Primer	Sequenz (5'→3')	TM [°C]	Variante
1_NreB_H159Q_F	CAAGAGAGTTGCAGGACGGCATTGTACAAG	75,2	NreB(H159Q)
1_NreB_H159Q_R	CTTGTAATGCGGTCCTGCAACTCTCTTG	75,2	NreB(H159Q)
nreB(Q164H)-F	CATGACGGCATTGTACACGAACTAATCAATGTC	67	NreB(Q164H)
nreB(Q164H)-R	GACATTGATTAGTTCGTGTACAATGCCGTCATG	67	NreB(Q164H)
2_NreB_Q164A_F	CATGACGGCATTGTAGCAGAACTAATCAATGTC	67	NreB(Q164A)
2_NreB_Q164A_R	GACATTGATTAGTTCGTGTACAATGCCGTCATG	67	NreB(Q164A)
3_NreB_Q164E_F	CATGACGGCATTGTAGAGGAACTAATCAATGTC	67	NreB(Q164E)
3_NreB_Q164E_R	GACATTGATTAGTTCCTCTACAATGCCGTCATG	67	NreB(Q164E)
4_NreB_D160A_F	TCAAGAGAGTTGCATGCCGGCATTGTACAAGAAC	69,5	NreB(D160A)
4_NreB_D160A_R	GTTCTTGTACAATGCCGGCATGCAACTCTCTTGA	69,5	NreB(D160A)
4_NreB_D160A_for2	GAGAGTTGCATGCCGGCATTGTACAAG	66,5	NreB(D160A)
4_NreB_D160A_rev2	CTTGTAATGCGGTCATGCAACTCTC	66,5	NreB(D160A)
5_NreB_D160S_F	CTCAAGAGAGTTGCATAGCGGCATTGTACAAGAAC	69,5	NreB(D160S)
5_NreB_D160S_R	GTTCTTGTACAATGCCGCTATGCAACTCTCTTGAG	69,5	NreB(D160S)
5_NreB_D160S_for2	GAGAGTTGCATAGCGGCATTGTACAAG	65	NreB(D160S)
5_NreB_D160S_rev2	CTTGTAATGCGGTCATGCAACTCTC	65	NreB(D160S)
NreC_D53A_F	GATGTTTTAATTATGGCTTTAAGTATGCCTC	65,8	NreC(D53A)
NreC_D53A_R	GAGGCATACTTAAAGCCATAATTAAAACATC	65,8	NreC(D53A)

3.3.4 Transformation

3.3.4.1 Transformation in *E. coli*

Plasmide wurden entweder per Elektroporation oder per Hitzeschock in die eigens hergestellten Bakterien transformiert.

100 mL LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurde 1-2 %-ig aus der Vorkultur (mit Antibiotikum) beimpft und bis zu einer OD_{578} von 0,5-0,7 gezüchtet (37 °C; 180 rpm). Um das Wachstum zu stoppen, wurden die Zellen auf Eis gekühlt und alle folgenden Schritte mit kalten Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Inkubation abzentrifugiert (5.000 rpm; 20 min; 4 °C; Avanti-J-E, Rotor JA25.50), gewaschen und in Aliquots zu je 50-200 µL bei -80 °C gelagert. Für die Elektrokompentenz wurden die Zellen mit MOPS-Puffer (15 % (v/v) Glycerin und 1 mM MOPS) mehrmals gewaschen (30 mL, 10 mL, 5 mL) und das Pellet in 600 µL MOPS-Puffer resuspendiert. Für die Hitzekompentenz wurden die Zellen mit TSB-Medium (100 g/L PEG 6000; 10 mM $MgSO_4$; 10 mM $MgCl_2$ und 20 g/L LB-Medium; sterilfiltriert) gewaschen (50 mL, 10 mL, 6 mL) und das Pellet in 2 mL TSB-Medium resuspendiert.

Für die Elektroporation wurden 50 µL elektrokompentente Zellen mit 10 µL hitzeinaktiviertem Ligationsansatz bzw. mit 10-100 ng Plasmid gemischt. Die Transformation wurde in gekühlten Elektroporationsküvetten bei 2,5 kV durchgeführt. Dem Ansatz wurde sofort nach der Elektroporation 1 mL auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium (SOB-Medium (Carl Roth) mit 3,6 g/L Glukose) zugeben und die Zellen für 1-2 h bei 37 °C regeneriert. Die Regeneration fand entweder im Schüttelinkubator bei 180 rpm oder im Thermoblock bei 1000 rpm statt. Es wurde entweder der komplette Transformationsansatz oder nur 100 µL auf selektivem LB-Agar ausplattiert und die Platten bei 37 °C inkubiert. Für den Hitzeschock wurde 1-3 µL DNA mit 50 µL hitzekompenten Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 42 s bei 45 °C, gefolgt von 2 min auf Eis. Die Zellen wurden mit 1 mL vorgewärmtem SOC-Medium gemischt und wie oben beschrieben regeneriert. Der komplette Ansatz wurde auf selektivem LB-Agar ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

3.3.4.2 Transformation in *S. carnosus*

Die Herstellung der elektrokompenten Zellen und die Elektroporation wurden nach einem veränderten Protokoll nach Löfblom *et al.*, 2006 durchgeführt. 500 mL BM-Medium wurde 1 %-ig aus einer Vorkultur angeimpft und in einem Schikanekolben (2 L) bis zu einer OD_{578} von 0,6 inkubiert (37 °C; 180 rpm). Das Wachstum der Zellen wurde durch Inkubation auf Eis gestoppt. Alle weiteren Schritte fanden ebenfalls gekühlt statt und es wurden sterile, eiskalte Lösungen verwendet. Die Zellen wurden pelletiert (10.000 rpm; 20 min; 4 °C; Avanti J-E Rotor JA25.50). Das Pellet wurde jeweils dreimal mit 30 mL $H_2O_{dest.}$ und mit 10 %-igem

Glycerin (v/v) gewaschen, anschließend in 1 mL Elektroporationspuffer (10 % (v/v) Glycerin und 0,5 M Saccharose) resuspendiert und in Aliquots zu je 60 µL bei -80 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurden die elektrokompetente Zellen vor der DNA-Zugabe für 5 min auf Eis aufgetaut und danach für 30 min bei RT inkubiert. 60 µL Zellen wurden mit 4 µg Plasmid-DNA gemischt und in sterile, nicht gekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Die Transformation wurde mit 2,5 kV durchgeführt. Sofort nach der Transformation wurden die Zellen mit 1 mL auf 37 °C vorgewärmtem BM gemischt und für 3 h bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator regeneriert. Nach der Regeneration wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (8.000 rpm; 5 min; RT; Eppendorf mini-Spin plus). Das Pellet wurde in 100 µL BM-Medium resuspendiert, auf selektiven BM-Agarplatten ausplattiert und für 24-48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.3.5 Konstruktion diverser Plasmide

3.3.5.1 Konstruktion von pMW2242

pMW2242 ist ein Derivat des Shuttle-Vektors pMW418, in den das DNA-Fragment *xylR-xyIA-nreB-his₆* aus dem Expressionsplasmid pCQE1nreB kloniert wurde (Abb. 5). pMW2242 erlaubt die molekulargenetische Mutation des *nreB*-Gens und Amplifikation in *E. coli* und die Überexpression und Isolierung des jeweiligen Proteins in *S. carnosus*. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Pst*I wurden über die Primer *xyIA-F* und *xyIRA-nreB-R* (Tab. 3) in pCQE1nreB eingefügt. In pMW418 sind die Schnittstellen bereits enthalten. Das entstandene Plasmid pMW2242 wurde zur Kontrolle der korrekten Ligation mit dem Enzym *Nde*I restringiert und sequenziert.

Tab. 3: **Primer für die Konstruktion von pMW2242:** Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die Schnittstelle der Restriktionsenzyme.

Primer	Sequenz (5'→3')	TM [°C]
<i>xyIA-F</i>	TATGAGAAATC <u>GGATC</u> CTAATTATTG	60,1
<i>xyIRA-nreB-R</i>	AAAGTTATTGTC <u>TGCAGG</u> ATTAC	57,6

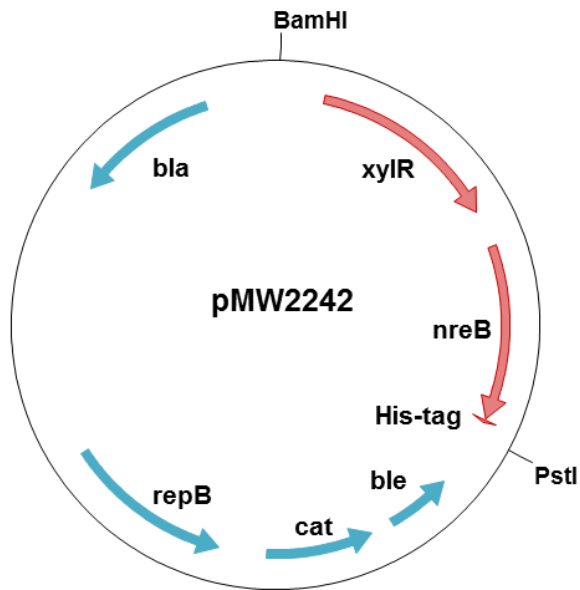


Abb. 5: **Plasmidkarte von pMW2242.** pMW2242 enthält die Gene für die Überexpression von NreB-His₆ aus pCQE1nreB (rot) und die für die Replikation in *E. coli* und *S. carnosus* wichtigen Gene aus pMW418 (blau).

3.3.5.2 Erstellung der Derivate von pMW418 und pMW1040 nach gerichteter Mutagenese

Um das Wachstum und den regulatorischen Phänotyp von NreB-Varianten zu untersuchen, wurden die Varianten gerichtet mutiert. Da die Plasmide sehr groß sind (pMW418 > 8 kb und pMW1040 > 10 kb), können zufällige Mutationen in den Amplifikaten nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde der mutierte Abschnitt aus *nreB* gegen den nichtmutierten Abschnitt in Plasmiden, die keine Mutagenese-PCR durchliefen, getauscht (Abb. 6). Dazu wurden die Restriktionsenzyme *XbaI* und *PmeI* verwendet, deren Schnittstellen bereits in *nreB* bzw. in *nreA* vorhanden sind. Die Gene aus vorher mutierten Plasmiden wurde mit den PCR-Primern pMW1040_nreAB_XbaI-F und pMW1040_nreB_PmeI-R amplifiziert (Tab. 4). Das Insert wurde in restringierte nichtmutierte Vektoren kloniert. Die Klonierung wurde durch Restriktion mittels *EcoRI* und anschließender Sequenzierung überprüft.

Tab. 4: **Primer für die Umklonierung von *nreB* nach gerichteter Mutagenese**

Primer	Sequenz (5'→3')	TM [°C]
pMW1040_nreAB_XbaI-F	CTGGTCTGGTAATTCTGAACG	62,1
pMW1040_nreB_PmeI-R	CTGTTCTTTAGGATCATCTC	56,9

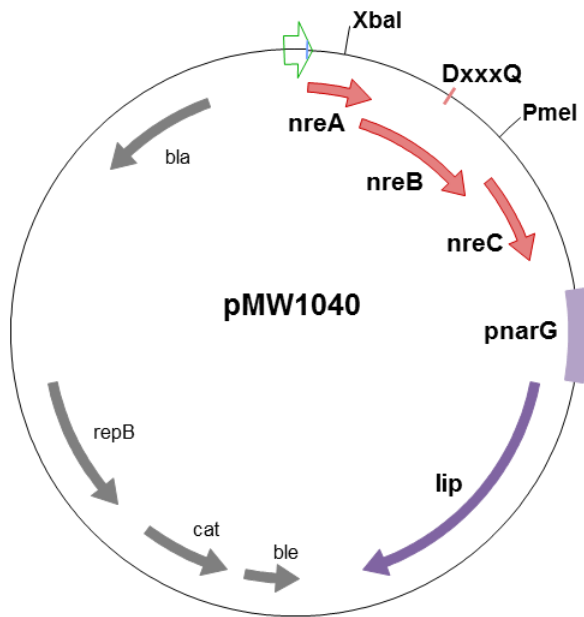


Abb. 6: **Plasmidkarte von pMW1040.** Über die Schnittstellen von *XbaI* und *PmeI* wurde der Bereich um das (mutierte) DxxxQ-Motiv in ein Plasmid, das keine Mutagenese-PCR durchlief, ausgetauscht.

3.3.5.3 Erstellung von pMW2544

pMW2544 ist ein Derivat von pMW1040, bei dem *nreAB* deletiert wurde (Abb. 7). Die Deletion der Gene *nreAB* erfolgte analog wie die Deletion von *nreA* zur Erstellung des Plasmids pMW1393 (pMW1040 aber $\Delta nreA$, Nilkens *et al.*, 2014). *nreA* und *nreB* wurden über die *Bgl*II-Schnittstellen deletiert. Die Schnittstellen wurden mit den Primern Del_nreA_R und F-Del-nreAB_BglII (Tab. 5) in pMW418 eingefügt. Nach Überprüfung der erfolgreichen Deletion (Kontrollverdau mit *Eco*RI und Sequenzierung mit Primer nreC-rev) wurde der Bereich um die Deletion mit den Primern F_Seq_SD_nreA und NreC_D53A_R (Tab. 1) amplifiziert. Das Amplifikat enthielt die natürlich vorkommenden Schnittstellen für *Sac*I und *Hind*III, über die die Deletion in pMW1040 gegen *nreABC* ausgetauscht wurde. Im entstandenen Plasmid pMW2544 befindet sich *nreC* im Leseraster mit *nreA* und steht unter der Kontrolle des nativen Promotors. Von *nreA* blieben die ersten 12 bp erhalten, *nreB* wurde komplett deletiert und *nreC* blieb vollständig erhalten. Das erfolgreiche Einbringen der Deletion wurde durch Kontrollverdau mit *Eco*RI und Sequenzierung überprüft.

Tab. 5: **Primer für die Erstellung von pMW2544.**

Primer	Sequenz (5'→3')	TM [°C]
F-Del-nreAB_BglII	GATAGGAGACAGATCTTTGAAGATAGTG	62,2
Del_nreA_R	CAAAGTAATCTGAAGATCTTACACTATTCAAC	61,8

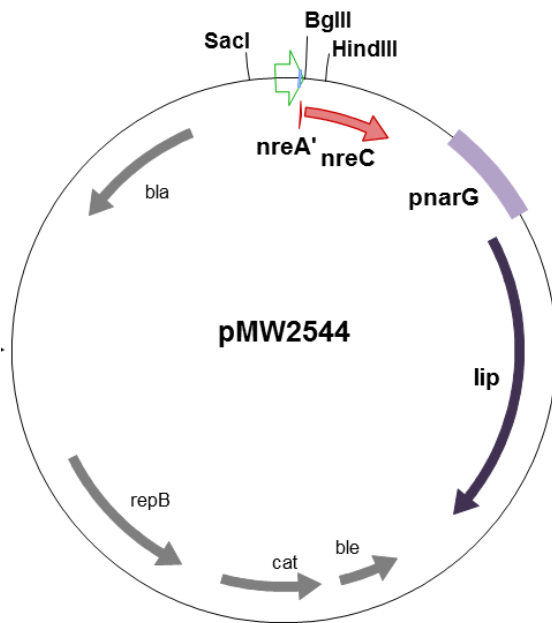


Abb. 7: **Plasmidkarten von pMW2544.** In pMW418 wurden *nreA* und *nreB* über *BglII* deletiert. Über *SacI* und *HindIII* wurde der deletierte Bereich gegen die *nreABC*-Gene in pMW1040 ausgetauscht. pMW2544 enthält das *nreC*-Gen unter Kontrolle des nativen Promotors (grün) mit der Shine-Dalgarno-Sequenz (blau).

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Reportergenstudien (Lipasetest)

Für die Messung der Genregulation wurden Promotortestplasmide verwendet, in denen die Aktivität der Lipase unter der Kontrolle des Promotors der Nitratreduktase (*narG-lip* Reportergenfusion) steht (Nilkens *et al.*, 2014). Die Lipase stammt aus *Staphylococcus hyicus* und wurde schon früher als Reporterprotein verwendet. Ihre Aktivität ist unempfindlich gegenüber Sauerstoff und Nitrat. Sie wird von *S. carnosus* ins Medium sekretiert, sodass ein direkter Nachweis ohne vorherigen Zellaufschluss möglich ist (Götz *et al.*, 1985). Das breite Substratspektrum umfasst neben Mono-, Di- und Triglyceride auch Tween 20 (van Oort *et al.*, 1989). Die Lipaseaktivität wurde qualitativ mit Agarplatten mit Tween 20 (10 mL/L) und quantitativ mit p-Nitrophenylcaprylat nachgewiesen (Nilkens *et al.*, 2014). Die Lipaseaktivität von *S. carnosus* m1 transformiert mit den Plasmiden pMW1001 (Δ NreABC), pMW1040 (NreABC), Derivaten von pMW1040, die für Varianten des DxxxQ-Motivs kodieren, pMW2342 (NreAB(H159Q)C) oder pMW2544 (Δ NreAB) wurde bestimmt.

Als Substrat im quantitativen Lipasetest wurde 5 mM p-Nitrophenylcaprylat in Lipasetestpuffer (nach Rosenstein *et al.*, 1992: 20 mM Tris/HCl pH 9; 0,1 % (v/v) Triton X-100 und 10 mM CaCl₂) verwendet. p-Nitrophenylcaprylat wird von der Lipase in p-Nitrophenol und Caprylat hydrolysiert. Unter basischen Bedingungen liegt p-Nitrophenol deprotoniert vor und ist gelb gefärbt (p-Nitrophenolat). Die Bildung von p-Nitrophenol wurde für 26 min photometrisch bei 415 nm verfolgt (BioTek, EL808-Photometer). Für die Messung in Dreifachbestimmung wurde 225 µL Puffer mit p-Nitrophenylcaprylat pro Vertiefung in 96 well-Mikrotiterplatten (Greiner Bio One) vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µL Überstand und vorsichtigem Mischen gestartet. Aus der maximalen Steigung der Kinetik und dem molaren Extinktionskoeffizienten für p-Nitrophenol von $16,97 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ wurde die spezifische Lipaseaktivität (U/g TG) bestimmt. 1 U Lipaseaktivität entspricht der Hydrolyse von 1 µM p-Nitrophenylcaprylat/min abhängig von der Zelldichte der Kultur (1 mL einer Kultur mit einer OD₅₇₈ von 0,1 entspricht einem Trockengewicht von 0,254 mg) (Nilkens *et al.*, 2014).

3.4.2 Anaerobe Isolierung von NreB und Quantifizierung des FeS-Clusters

Der Stamm *S. carnosus* m1 mit dem Plasmid pCQE1nreB (NreB-His₆) bzw. mit den Plasmiden, die für Varianten des DxxxQ-Motivs in NreB-His₆ kodieren, wurden anaerob gezüchtet. Alle Isolationsschritte fanden im Anaerobenzelt (Coy; Formiergas (95 % N₂, 5 % H₂)) statt. Für alle Schritte außerhalb des Zeltes wurden die Zellen bzw. das isolierte Protein in Gefäßen aufbewahrt, die mit einer Gummidichtung luftdicht verschlossen wurden. Es wurde Resuspensionspuffer A (50 mM HEPES pH 7,2; 20 % (v/v) Glycerin; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol und 10 mM β-Mercaptoethanol), Waschpuffer B (50 mM HEPES pH 7,2; 20 % (v/v) Glycerin; 1 M NaCl; 20 mM Imidazol und 1 mM β-Mercaptoethanol) und Elutionspuffer C (50 mM HEPES pH 7,2; 20 % (v/v) Glycerin; 300 mM NaCl; 150 mM Imidazol und 1 mM β-Mercaptoethanol) verwendet. Der Sauerstoff wurde durch Anaerobisieren (3x 15-30 min) und Begasen mit Stickstoff aus den Puffern entfernt und diese dann im Anaerobenzelt offen auf dem Magnetrührer für 18-24 h rührend inkubiert. β-Mercaptoethanol wurde erst vor dem Gebrauch zu den Puffern gegeben. NreB-His₆ wurde wie bei Müllner *et al.*, 2008 beschrieben anaerob isoliert. Die Aufschlusszyklen der mechanischen Lyse wurden jedoch erhöht (6x 2,5 min+1 min) und 4 mL BV Ni²⁺-NTA-Agarose (Macherey-Nagel) wurde

verwendet. Die Ni^{2+} -NTA-Agarose wurde vor dem Mischen mit dem Zelllysat für zwei Tage mit 60 BV Puffer A im Zelt anaerobisiert.

Braun gefärbte Fraktionen enthielten anaerobes NreB-His₆. Von diesen Fraktionen wurde ein Spektrum aufgenommen, um das für FeS-haltige Proteine typische Absorptionsmaximum bei 420 nm darzustellen (Khoroshilova *et al.*, 1995). Die jeweilige Fraktion wurde in eine mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossene Quarzküvette luftblasenfrei pipettiert. Das Spektrum wurde im UV-2450 UV/Vis-Spektrophotometer (Shimadzu) gegen Luft aufgenommen. Die Fraktionen wurden in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Das FeS-Cluster wurde durch Bestimmung des komplexierten Eisens im kolorimetrischen Test nach Fish (1988) mit Ferrozin (Stookey 1970) und durch Bestimmung des säurelabilen Sulfids quantifiziert (Nilkens 2013).

3.4.3 Isolierung von Proteinen aus *E. coli*

Die Isolierung von His-tag Proteinen erfolgte gemäß dem Handbuch zur Reinigung von His-Proteinen (Macherey-Nagel). Das Pellet der His₆-NreA Zucht wurde in 25 mL Puffer A (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7; 100 mM NaNO₃; 300 mM NaCl; 20 % (v/v) Glycerin und 10 mM Imidazol) resuspendiert und mittels French-Press aufgeschlossen (3 Lysevorgänge; $13,8 \cdot 10^7 \text{ kg s}^{-2} \text{ m}^{-1}$). 2 mL BV Ni^{2+} -NTA-Agarose (Macherey-Nagel) wurde verwendet, über welches das Proteinlysat zweimal überführt wurde. Die Ni^{2+} -NTA-Agarose mit gebundenem Protein wurde mit 5x 4 mL Puffer B (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7; 100 mM NaNO₃; 1 M NaCl; 20 % (v/v) Glycerin und 20 mM Imidazol) gewaschen und His₆-NreA mit 10x 1 mL Puffer C (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7; 20 mM NaNO₃; 300 mM NaCl; 20 % (v/v) Glycerin und 150 mM Imidazol) eluiert. NaNO₃ wurde nur bei Puffern für die Isolierung von Nitrat-gebundenem His₆-NreA verwendet. His₆-NreA wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Isolierung von His₆-ArcA wurde analog durchgeführt mit folgenden Unterschieden. Das Pellet wurde in 20 mL Puffer 1 (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7; 300 mM KCl; 5 % (v/v) Glycerin und 20 mM Imidazol) resuspendiert. Die Zellen wurden in zwei Lysedurchgängen aufgeschlossen. Es wurden nur 1,5 mL BV Ni^{2+} -NTA-Agarose verwendet. Das an die Säule gebundene Protein wurde mit 3x 3 mL Puffer 2 (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7; 300 mM KCl; 5 % (v/v) Glycerin und 40 mM Imidazol) gewaschen und mit 10x 0,5 mL Puffer 3 (50 mM

Kaliumphosphatpuffer pH 7; 300 mM KCl; 5 % (v/v) Glycerin und 500 mM Imidazol) eluiert. Das Protein wurde bei 4 °C gelagert (Drapal und Sawers, 1995).

Die Isolierung von NreC-Strep erfolgte gemäß der Anleitung zur Expression und Reinigung von Proteinen mit Strep-Tag (IBA). Das Pellet wurde in 20 mL Puffer W (100 mM Tris/HCl pH 8; 150 mM NaCl und 1 mM EDTA) resuspendiert und mittels French-Press aufgeschlossen (3 Lysevorgänge; $13,8 \cdot 10^7 \text{ kg s}^{-2} \text{ m}^{-1}$). Es wurde 2 mL BV Strep-Tactin Sepharose (IBA) verwendet, auf die das Proteinlysate zweimal überführt wurde. Die Strep-Tactin Sepharose mit gebundenem Protein wurde mit 5x 2 mL Puffer W gewaschen und NreC-Strep mit 6x 1 mL Puffer E (Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Wurde NreC-Strep für die *in vitro* Phosphorylierung mit Carbamoylphosphat isoliert wurde EDTA im Puffer weggelassen. NreC-Strep wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Das Säulenmaterial wurde nach jeder Isolierung gemäß der jeweiligen Protokolle gereinigt.

3.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Es wurde maximal 20 µL Probe eingesetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte entweder in 1,5 mL Reaktionsgefäßen und Messung in Küvetten oder in 96-Deepwellplatten und 96 well-Mikrotiterplatten (Greiner Bio One) mittels eines Proteinstandards (Albumin Fraktion V) mit Konzentrationen von 0 µg/mL bis 40 µg/mL.

3.4.5 SDS-PAGE

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE im elektrischen Feld getrennt (Laemmli, 1970). Die SDS-PAGE fand in dem Mini-PROTEAN Elektrophorese-System (Bio-Rad) bei 200 V für 50 min in SDS-Laufpuffer (5,44 g/L Tris; 25,92 g/L Glycin und 9 mL/L 10 % SDS (w/v)) statt. Abhängig von dem Molekulargewicht wurde ein 12,5 %-iges oder 15 %-iges Trenngel verwendet und ein 6,5 %-iges Sammelgel (Sambrook und Russell 2001). Die Proteine wurden vor der SDS-PAGE mit 2-5x Auftragspuffer (1x Auftragspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 6,8; 100 mM DTT; 2 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau und 10 % (v/v) Glycerin) versetzt und für 5 min bei 99 °C denaturiert. Die Proben der Phosphorylierungsexperimente wurden nicht Hitze-denaturiert.

Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung (10 % (v/v) Eisessig; 50 % (v/v) Ethanol und 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue 250) über Nacht auf dem Kippschalter mit anschließendem Entfärben durch Aufkochen in Wasser sichtbar gemacht. Die Gele der Phosphorylierungsexperimente wurden mit einer Entfärberlösung (10 % (v/v) Eisessig und 50 % (v/v) Ethanol) entfärbt. Die Gele wurden auf einer Heizplatte im Vakuum getrocknet.

3.4.6 Messung der Nitritkonzentration

Die Nitritkonzentration im Medium der Zuchten für die Wachstumskurven wurde mit 1 % (w/v) Sulfanilamid (in 2,5 M HCl) und 0,2 % (w/v) N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamin quantifiziert (Nicholas und Nason 1957). Die Sulfanilamid-Lösung wurde lichtgeschützt unter dem Abzug aufbewahrt. Die N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamin-Lösung wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Die Konzentration an gebildetem Nitrit wurde über eine Eichgerade (0-20 µM Nitrit) bestimmt.

Zusätzlich wurde Nitrit noch semiquantitativ mit Nitrat-Teststäbchen (MQuant, MerckMillipore) nachgewiesen. Der Nachweis beruht auf der oben beschriebenen Methode mit einer zusätzlichen Reduktion vorhandener Nitrat-Ionen.

3.4.7 Anaerobe Phosphorylierung mit [γ -³³P]-ATP

Die *in vitro* Phosphorylierungsstudien mit [γ -³³P]-ATP wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll nach Nilkens *et al.*, 2014 im Anaerobenzelt mit isoliertem Protein durchgeführt. Alle Puffer wurden vor Verwendung dreimal für 15 min anaerobisiert und danach im Anaerobenzelt für mindestens 12 h offen auf dem Magnetrührer rührend inkubiert.

Nach der Phosphorylierungsreaktion wurden die Proteine durch SDS-PAGE separiert. Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte durch Inkubation der SDS-Gele auf der PhosphorImager-Platte (Fuji). Die Gele wurden im Saran-Wrap eingeschlagen und für mindestens 18-48 h bei 4 °C inkubiert. Radioaktive Strahlung bewirkt eine Kristallstrukturänderung der Oberfläche der PhosphorImager-Platte. Diese Schwärzung der PhosphorImager-Platte wurde durch den Plattenleser des Instituts für Kernchemie der Universität Mainz ausgelesen. Die Intensität der Schwärzung korreliert mit der Menge an phosphoryliertem Protein und wurde als integrale optische Dichte (IOD) mit dem Programm

GelProAnalyzer 6.0 bestimmt. Die PhosphorImager-Platte wurde durch Beleuchtung mit Licht regeneriert (mindestens 15 min im Eraser).

Alternativ erfolgte die Bestimmung der radioaktiv-markierten Proteine mittels Szintillationszähler (Liquid Scintillation System, LS6000SC, Beckman). Die Proteine wurden im SDS-Gel getrennt. Die Proteinbanden im gefärbten oder ungefärbten Gel wurden ausgeschnitten, in Szintillationsvials überführt und in 500 μ L 30 % (v/v) H_2O_2 für 16 h bei 40 °C gelöst. Nach Zugabe von 3 mL Szintillationslösung wurden die Proben im Hybridisierungssofen bei 6 rpm taumelnd für 3 h gemischt. Danach erfolgte die Messung im Szintillationszähler. Als Kontrolle wurde oberhalb der Proteinbanden ein Gelstück ausgeschnitten und wie oben beschrieben behandelt. Dessen Aktivität wurde als Blindwert von der Aktivität der Proben abgezogen. Die Menge an radioaktiv-markierten Proteinen wurde anhand einer Eichgerade mit 0,5 pmol bis 10 pmol ATP-Mix berechnet, die aus der ATP-Lösung (7,3 TBq/mmol; 3,3 μ M in 10 mM Tris/HCl pH 8 + 2 mM DTT) verdünnt wurde und analog zu den Proben bzw. der Kontrolle behandelt wurde.

Die in den einzelnen Experimenten maximal hervorgerufene Phosphorylierung (entweder IOD oder der Zerfälle) wurde als 100 % definiert.

Für die **Autophosphorylierung** von NreB wurde 15 μ M NreB-His₆ im Reaktionspuffer (50 mM HEPES pH 8; 50 mM KCl; 5 mM MgCl_2 ; 0,5 mM EDTA und 2 mM DTT) verdünnt und mit Puffer C (50 mM HEPES pH 7,2; 20 % (v/v) Glycerin; 300 mM NaCl; 150 mM Imidazol und 1 mM β -Mercaptoethanol) auf ein Volumen von 60 μ L aufgefüllt. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 4 μ L ATP-Lösung (7,3 TBq/mmol; 3,3 μ M in 10 mM Tris/HCl pH 8 und 2 mM DTT) gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von 8 μ L 2x SDS-Auftragspuffer zu 8 μ L Probe gestoppt. Für die NreA-abhängige NreB-Autophosphorylierung wurde NreB-His₆ mit dem 40-fachen molekularen Überschuss an His₆-NreA bzw. Nitrat-gebundenem His₆-NreA wie oben beschrieben phosphoryliert. Als Kontrolle wurde statt His₆-NreA der jeweilige Elutionspuffer zu NreB-His₆ pipettiert. Die Proben wurden ohne thermische Denaturierung im SDS-Gel getrennt (50-60 min; 200 V).

Für den **Phosphotransfer** von NreB-³³P auf NreC wurde 30 μ M NreB-His₆ wie für die Autophosphorylierung beschrieben in einem 120 μ L Ansatz durch Zugabe von 20 μ L ATP-Lösung phosphoryliert. Nach 201 min wurde 30 μ M NreC-Strep zum

Phosphorylierungsansatz gegeben. Vor bzw. nach NreC-Strep Zugabe wurde zu den angegebenen Zeitpunkten 8 μL bzw. 16 μL Probe entnommen, abgestoppt und im SDS-Gel getrennt.

Durch den Phosphotransfer von NreB- ^{33}P auf NreC wurde NreC phosphoryliert (NreC- ^{33}P) gefolgt von einer zeitabhängigen Dephosphorylierung von NreC- ^{33}P . Der Einfluss von NreB als Phosphatase oder die der intrinsischen NreC-Phosphataseaktivität auf die NreC- ^{33}P Dephosphorylierung kann durch die bisherigen Versuchsbedingungen nicht eindeutig geklärt werden. Nach Zugabe von NreC-Strep liegt im Ansatz ein Gemisch aus phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem Protein (NreB-His₆ und NreC-Strep) und ATP, ADP und freiem ^{33}P vor. Es sollte ein Versuchsaufbau etabliert werden, in dem NreC- ^{33}P schnell von NreB getrennt werden konnte gefolgt von einer Zugabe von nichtphosphoryliertem NreB zu NreC- ^{33}P . Dadurch soll die NreB-abhängige NreC- ^{33}P **Dephosphorylierung** gemessen werden. Die spezifische NreC-Abtrennung aus dem Phosphorylierungsansatz erfolgte mittels Strep-Tactin Spin-Columns (IBA). NreC-Strep bindet an die immobilisierte Strep-Tactin Sepharose der Zentrifugensäule und wurde mit Biotin-haltigem Elutionspuffer eluiert.

30 μM NreB-His₆ wurde wie für die Autophosphorylierung beschrieben in einem 500 μL Ansatz durch Zugabe von 85 μL ATP-Lösung phosphoryliert. Nach 201 min wurde 30 μM NreC-Strep zum Phosphorylierungsansatz gegeben. Nach 0,5-1 min Inkubation wurde der komplette Ansatz auf Strep-Tactin Spin-Columns pipettiert, gemäß dem Herstellerprotokoll zweimal mit 500 μL Puffer W (100 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl und 1 mM EDTA) gewaschen und mit 60 μL Puffer EB (Puffer W mit 2 mM D-Biotin) eluiert. Der Elutionsschritt wurde mit dem Eluat wiederholt, um die Proteinausbeute zu erhöhen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bis zum Erreichen der maximalen Umdrehung. Für die Untersuchung der NreB-abhängigen NreC- ^{33}P Dephosphorylierung wurde 1 μM , 5 μM oder 10 μM NreB-His₆ im Reaktionspuffer verdünnt und mit dem Elutionspuffer C auf ein Volumen von 80 μL aufgefüllt. Die Dephosphorylierung wurde 3 min nach der Elution durch Zugabe von 20 μL eluiertem NreC gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde 10 μL Probe entnommen, abgestoppt und im SDS-Gel getrennt. Wurde die Dephosphorylierung in Anwesenheit von NreA bzw. Nitrat-gebundenem NreA untersucht, wurde der Nitratsensor im 40-fachen molekularen Überschuss dem Ansatz zugegeben. Um die Stabilität von NreC- ^{33}P im Eluat vor

der Inkubation mit NreB zu bestimmen, wurden zusätzliche Proben 1 min und 3 min nach der Elution genommen.

3.4.8 Phosphorylierung mit Carbamoylphosphat

Antwortregulatoren können auch durch niedermolekulare Phosphodonoren wie Acetylphosphat oder Carbamoylphosphat phosphoryliert werden (Lukat *et al.*, 1992). Um zu testen, ob NreC ebenfalls *in vitro* durch niedermolekulare Phosphodonoren aktiviert werden kann, wurde NreC-Strep isoliert (ohne EDTA in den verwendeten Puffern) und mit Carbamoylphosphat als Phosphodonor phosphoryliert (Wackwitz *et al.*, 1999; Barbieri und Stock, 2008). Die analoge Phosphorylierung von His₆-ArcA diente als Kontrolle. 10-20 µg Protein wurde im Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM Glycerin und 5 mM MgCl₂) mit 50 mM Carbamoylphosphat bei 25 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Phosphorylierungsreaktion durch Zugabe von 5x SDS-Auftragspuffer gestoppt. Die Proben wurden bis zur SDS-PAGE auf Eis gelagert. Der Nachweis von *in vitro* phosphoryliertem NreC erfolgte mittels Phos-tag basierter SDS-PAGE. Phos-tag ist ein phosphoaffines Reagenz, welches in Anwesenheit von zweiwertigen Kationen wie Mn²⁺ oder Zn²⁺ phosphorylierte Proteine bindet. Die Bindung von phosphoryliertem Protein bewirkt einen Gelshift, durch den phosphoryliertes von nichtphosphoryliertem Protein unterschieden werden kann. Für den Nachweis wurde dem Trenngel vor dem Polymerisieren 75 µM Phos-tag und 150 µM MnCl₂ zugegeben. Die SDS-PAGE erfolgte ohne thermische Denaturierung der Proben bei 4 °C.

4. Ergebnisse

4.1 NreB enthält ein DxxxQ-Phosphatasemotiv

Das NreBC-Zweikomponentensystem von *S. carnosus* zeichnet sich durch eine O₂-abhängige Phosphorylierung aus. Die Autophosphorylierung der Sensorkinase NreB und der Phosphoryltransfer auf den Antwortregulator NreC wurden zuvor ausführlich untersucht (Fedtke *et al.*, 2002, Nilkens *et al.*, 2014). Die Mechanismen, die zur Dephosphorylierung von NreC führen sind dagegen unbekannt.

In dem Nitratsensor NarX von *E. coli* wurde das DxxxQ-Phosphatasemotiv identifiziert. Es findet sich direkt im Anschluss an den konservierten His-Rest H399, der phosphoryliert wird. Dieses Motiv ist wichtig für die Autophosphorylierung der Sensorkinase und für die Dephosphorylierung des Antwortregulators NarL. Der Phosphoryltransfer von NarX auf NarL ist nicht betroffen (Huynh *et al.*, 2010). NarX gehört zu den HisKA_3-Sensorhistidinkinasen (Pfam PFO 7730; Quelle: pfam.xfam.org/family/PFO_7730). Auch in anderen HisKA_3-Sensorkinasen findet sich das DxxxQ-Phosphatasemotiv. Um zu klären, ob die HisKA_3-Kinase NreB ebenfalls ein DxxxQ-Phosphatasemotiv besitzt, wurde die Primärsequenz von NreB mit der Primärsequenz von NarX und weiteren HisKA_3-Kinasen verglichen (Abb. 8).

			DxxxQ	
			└─┬─┘	
NarX_Ecoli	394	IAREL	H D SIA Q SLSCM	409
NreB_Sca	154	ISREL	H D GIV Q ELINV	169
DosS_Mtub	390	IARDL	H D HVI Q RLFAI	405
DosT_Mtub	387	IARDL	H D HVI Q RLFAV	402
VraS_Saureus	151	LAREL	H D SVS Q QLFAA	166
DesK_Bsubti	183	IARDL	H D TLG Q KLSLI	198
		:	: * : * * * :	* *

Abb. 8: **Alignment des DxxxQ-Motivs der Kinasedomäne von HisKA_3-Sensorkinasen.** Hervorgehoben sind die konservierten Reste des DxxxQ-Motivs (rot) und der konservierte His-Rest, der phosphoryliert wird (fett). Die Zahlen geben die Aminosäure im Protein an. Alignment von NarX aus *E. coli* (NarX_Ecoli; Acc. P0AFA2), NreB aus *S. carnosus* (NreB_Sca; Acc. Q7WZY5), DosS aus *Mycobacterium tuberculosis* (DosS_Mtub; Acc. P9WVGK3), DosT aus *M. tuberculosis* (DosT_Mtub; Acc. P9WVGK1), VraS aus *S. aureus* (VraS_Saureus; Acc. Q99SZ7) und DesK aus *Bacillus subtilis* (DesK_Bsubti; Acc. O34757).

In NreB befindet sich das DxxxQ-Motiv an Position 160-164 des Proteins und folgt wie in NarX unmittelbar auf den konservierten Histidinrest H159, der anaerob phosphoryliert wird. Die Rolle des identifizierten DxxxQ-Motivs von NreB wurde durch Aminosäuresubstitutionen des konservierten Aspartats- und Glutaminrests untersucht.

4.2 Einfluss der Varianten des NreB(DxxxQ)-Motivs auf die *narG-lip* Expression

Das NreBC-Zweikomponentensystem reguliert zusammen mit dem Nitratsensor NreA die Expression der Gene für die anaerobe Nitratatmung: *narGHJ* (Gene der dissimilatorischen Nitratreduktase), *nirRBD* (Gene der Nitritreduktase) und *narT* (Gen des vermutlichen Nitrattransporters) (Fedtke *et al.*, 2002, Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). Der Einfluss von verschiedenen Faktoren wie Sauerstoff oder Nitrat auf die Genexpression wird mit der *narG-lip* Reporterengenfusion in *S. carnosus* untersucht. Bei dieser steht die Genexpression des Lipasegens von *S. hyicus* unter der Kontrolle des Promotors der Nitratreduktase (Nilkens *et al.*, 2014). Die Lipaseaktivität ist ein Maß für die Expression der Zielgene. Die Messungen wurden in dem Stamm *S. carnosus* m1 durchgeführt. In diesem sind die Gene *nreABC* durch ein Erythromycinresistenzgen substituiert (Fedtke *et al.*, 2002). Die *narG-lip* Reporterengenfusion wurde plasmidkodiert entweder ohne *nreABC* oder gemeinsam mit *nreABC* in gleicher Orientierung eingebracht. Dadurch kann der Einfluss von NreABC, der NreB-Varianten des DxxxQ-Phosphatasemotivs, Sauerstoff und Nitrat auf die *narG-lip* Expression untersucht werden.

In Abwesenheit von NreABC wurde *narG-lip* schwach exprimiert (Abb. 9). Die Aktivität lag aerob wie anaerob unabhängig von Nitrat unter 20 U/g TG. Erst bei Anwesenheit von wildtypischem NreABC in Verbindung mit Anaerobiose wurde *narG-lip* signifikant exprimiert. Nitrat stimulierte die Expression zusätzlich um den Faktor 1,4 (Abb. 9).

4.2.1 Varianten von NreB(D160) haben keinen Einfluss auf die *narG-lip* Expression

In *E. coli* ist NarX(D400) essentiell für die Autokinaseaktivität des Nitratsensors und für die Phosphatase, durch die der Antwortregulator NarL dephosphoryliert wird. NarX(D400)-Varianten bewirkten den vollständigen Verlust der Expression des Reporters *narG-lacZ*; die für wildtypisches NarX typische Nitratinduktion wurde nicht beobachtet (Huynh *et al.*, 2010).

Um die Bedeutung des Aminosäurerests D160 für die regulatorische Funktion von NreB zu untersuchen, wurden die Varianten NreB(D160A) und NreB(D160S) erstellt und die Änderung der Expression von *narG-lip* in Anwesenheit von NreAB(D160A)C und NreAB(D160S)C untersucht (Abb. 9).

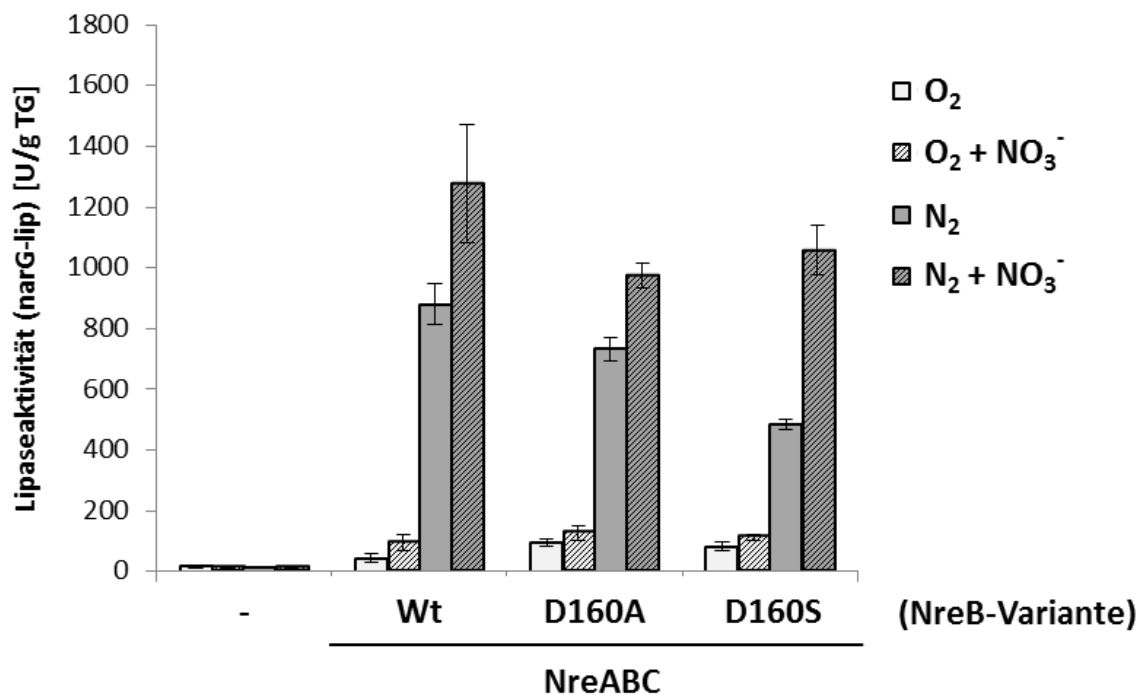


Abb. 9: **Einfluss von NreB(D160)-Varianten auf die *narG-lip* Expression.** Getestet wurde die *narG-lip*-Expression in *S. carnosus* m1 in Abwesenheit von NreABC (-; pMW1001), wildtypischem NreABC (Wt; pMW1040), NreAB(D160A)C (D160A; pMW2343) und NreAB(D160S)C (D160S; pMW2333). Die Bakterien wuchsen aerob bzw. anaerob ohne bzw. mit 10 mM Nitrat in BML-Medium. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von drei unabhängigen Kulturen mit jeweils drei Messungen an.

Beide Varianten zeigten einen wildtypischen Phänotyp in der *narG-lip* Expression. In Anwesenheit von wildtypischem NreB war die Expression von *narG-lip* unter aeroben Bedingungen unabhängig von der Nitratverfügbarkeit niedrig. Anaerobiose bewirkte eine Steigerung der Expression um den Faktor 20. Die Nitratverfügbarkeit bei gleichzeitigem anaerobem Wachstum stimulierte die Expression nochmals um den Faktor 1,4. Anaerobiose stellt demnach den stärksten Induktor dar. In den NreB(D160A) und NreB(D160S)-Varianten waren die Expressionen und ihre Reaktionen auf die Anwesenheit von Sauerstoff oder Nitrat der Expression des Wildtyps ähnlich, es gab nur graduelle Unterschiede. So war mit

NreB(D160S) die Induktion des Reporters unter anaeroben Bedingungen ohne Nitrat signifikant reduziert, nicht aber anaerob mit Nitrat.

4.2.2 Varianten von NreB(Q164) führen zu einer Nitrat-unabhängigen anaeroben *narG-lip* Expression

In NarX ist der Aminosäure-Rest Q404 wichtig für die Dephosphorylierung des Antwortregulators NarL in *E. coli*. Die Art des Austausches des Restes bestimmt die Art der Funktionsänderung von NarX im *narG-lacZ* Reportersystem. Die NarX(Q404)-Varianten reduzieren die Autophosphorylierung von NarX und die Dephosphorylierung von NarL. Dies ist besonders in den Q404-Substitutionen zu Alanin, Glutaminsäure oder Histidin ausgeprägt (Huynh *et al.*, 2010). Der Effekt dieser drei analogen Substitutionen auf die Funktion von NreB(Q164) wurde getestet (Abb. 10).

Während die getesteten NreB(D160)-Varianten keine signifikanten Änderungen der Lipaseaktivität gegenüber dem Wildtyp zeigten, veränderten die Varianten NreB(Q164A) und NreB(Q164H) die Lipaseaktivität. Die Aktivität der Variante NreAB(Q164A)C war nach aerobem Wachstum mehr als dreimal so hoch wie die des Wildtyps. Nitrat hatte unter anaeroben Bedingungen keinen stimulierenden Effekt. Die Lipaseaktivität der Variante NreAB(Q164H)C ähnelte der Variante NreAB(Q164A)C im aerobem Wachstum und hinsichtlich des Verlusts der Nitratstimulierung im anaerobem Wachstum. Im Vergleich zu NreAB(Q164A)C war die Lipaseaktivität von NreAB(Q164H)C nach aerobem Wachstum nochmals erhöht; ohne Nitrat um den Faktor 1,5 und mit Nitrat um den Faktor 1,8. Die Lipaseaktivität nach anaerobem Wachstum ohne und mit Nitrat entsprach der Aktivität von NreAB(Q164A)C. Die dritte gemessene Variante NreAB(Q164E)C zeigte ein wildtypisches Expressionsmuster mit einer niedrigen aeroben Lipaseaktivität ohne und mit Nitrat. Anaerobes Wachstum von NreAB(Q164E)C führte zwar zu einer niedrigeren Lipaseaktivität gegenüber dem Wildtyp-NreB, der stimulierende Effekt durch Nitrat war mit einem Faktor von 2,1 jedoch ausgeprägter.

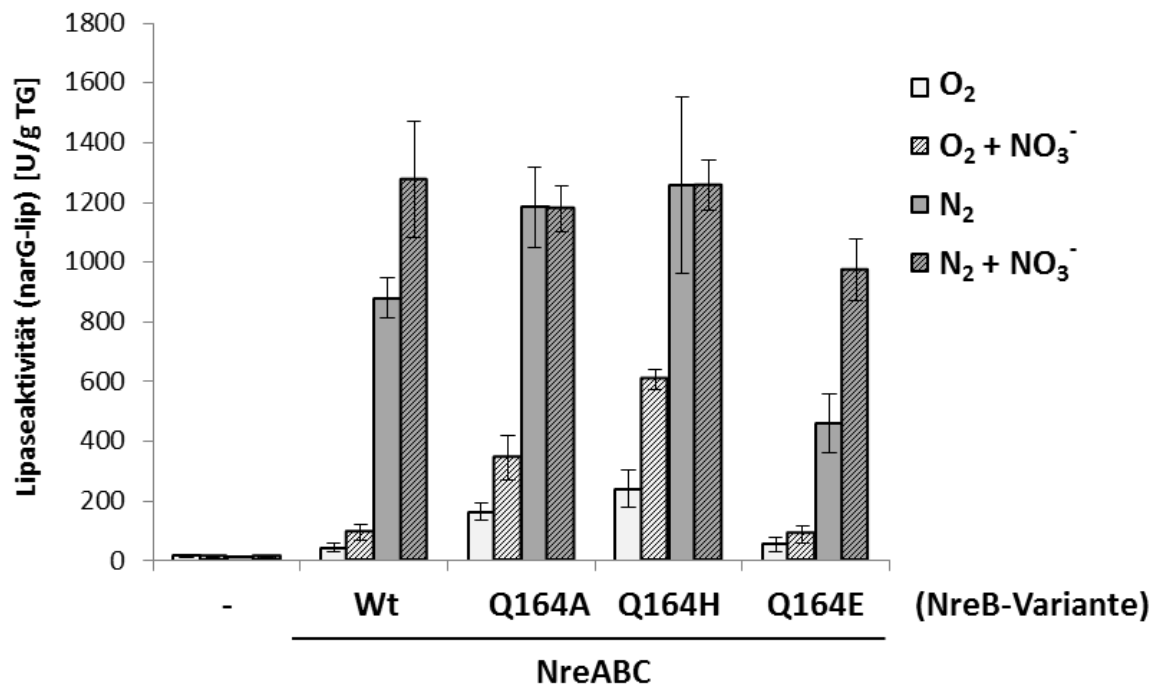


Abb. 10: **Einfluss von NreB(Q164)-Varianten auf die *narG-lip* Expression.** Getestet wurde die *narG-lip*-Expression in *S. carnosus* m1 in Abwesenheit von NreABC (-; pMW1001), wildtypischem NreABC (Wt; pMW1040), NreAB(Q164A)C (Q164A; pMW2331), NreAB(Q164H)C (Q164H; pMW2241) und NreAB(Q164E)C (Q164E; pMW2332). Die Bakterien wuchsen aerob bzw. anaerob ohne bzw. mit 10 mM Nitrat in BML-Medium. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von drei unabhängigen Kulturen mit jeweils drei Messungen an.

4.3 Anaerobes Wachstum von Varianten des NreB(DxxxQ)-Motivs

Die Verfügbarkeit von Nitrat und die anaerobe Reduktion dieses terminalen Elektronenakzeptors verschafft *S. carnosus* einen deutlichen Wachstumsvorteil unter Anaerobiose gegenüber Bakterien ohne Nitrat. Zur Ausprägung des Wachstumsvorteils ist NreABC erforderlich. Durch Substitution der drei Proteine durch das Erythromycinresistenz-Protein verliert *S. carnosus* diesen Wachstumsvorteil (Fedtke *et al.*, 2002).

Der Einfluss des NreB(DxxxQ)-Phosphatasemotivs auf das Wachstum von *S. carnosus* wurde mit den oben beschriebenen Varianten getestet. Das anaerobe Wachstum von *S. carnosus* m1 mit plasmidkodiertem NreABC bzw. DxxxQ-Varianten wurde in BM-Medium mit und ohne Nitrat gemessen. Von den Wachstumskurven wurde die Verdopplungszeit t_d errechnet und das gebildete Nitrit bestimmt.

Bei Abwesenheit von NreABC gab es keinen Wachstumsunterschied für den Stamm *S. carnosus* m1 mit und ohne Nitrat. Beide Kulturen erreichten eine OD₅₇₈ von 0,8. Die Stämme, die plasmidkodiertes NreABC exprimierten, wuchsen bei Verfügbarkeit von Nitrat

schneller. In den ersten drei Stunden wuchsen die Kulturen annähernd gleich, danach stimulierte Nitrat das Wachstum und die erreichte OD_{578} war um den Faktor 1,5 erhöht (Abb. 11).

4.3.1 NreB(D160)-Varianten zeigen einen Wachstumsvorteil gegenüber wildtypischem NreB

Die Stimulierung des anaeroben Wachstums durch Nitrat wurde genau wie bei Wildtyp-NreB auch für die Varianten NreAB(D160A)C und NreAB(D160S)C beobachtet (Abb. 11). Ohne Nitrat wuchsen beide Stämme vergleichbar mit dem Wildtyp. Bei Verfügbarkeit von Nitrat ähnelte ihr Wachstum in den ersten 5-7 h dem von wildtypischem NreB. Danach stimulierte Nitrat deren Wachstum. Diese Stimulierung war im Stamm mit NreAB(D160A)C früher zu beobachten. Nach 10 h war die erreichte OD_{578} um den Faktor 1,2 (bei NreB(D160S)) und um den Faktor 1,3 (bei NreB(D160A)) höher wie der mit wildtypischem NreB.

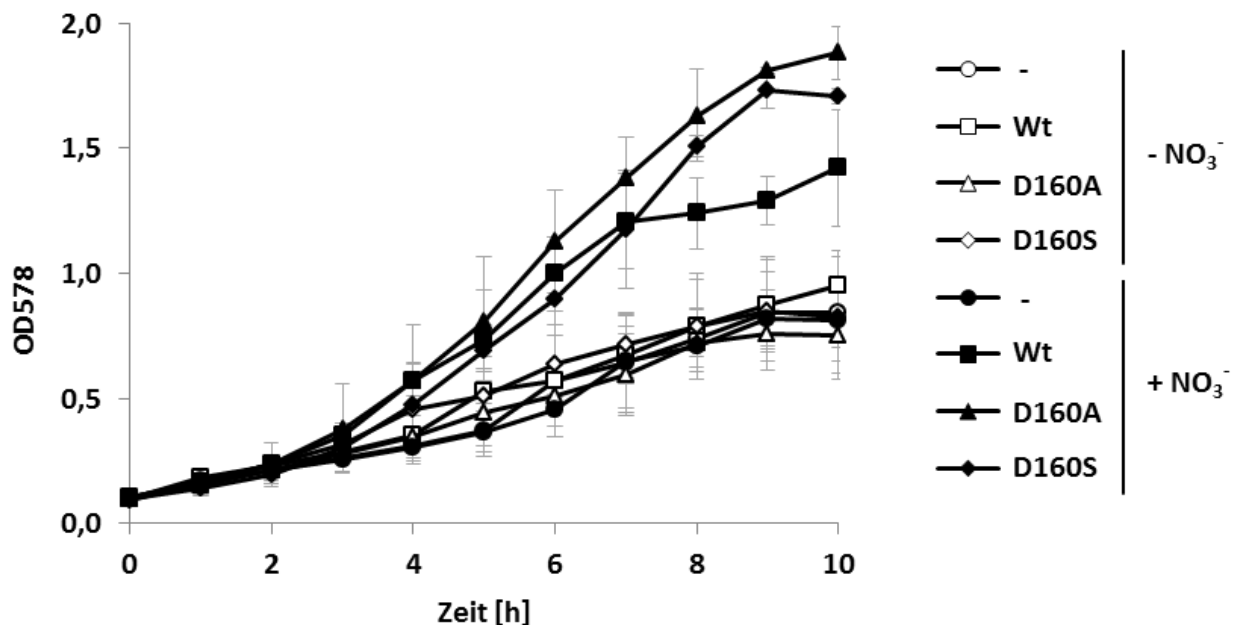


Abb. 11: **Anaerobes Wachstum von NreB(D160)-Varianten.** Das anaerobe Wachstum erfolgte ab einer OD_{578} von 0,1 in BM-Medium ohne (offene Symbole) bzw. mit 10 mM Nitrat (gefüllte Symbole) in *S. carnosus* (m1). Getestet wurde das Wachstum ohne NreABC (-; pRB473), mit wildtypischem NreABC (Wt; pMW418), NreAB(D160A)C (D160A; pMW2417) und NreAB(D160S)C (D160S; pMW2421). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Kulturen an.

4.3.2 NreB(Q164E)-Variante zeigt einen Wachstumsvorteil gegenüber wildtypischem NreB

Für NreB(Q164) wurden die Varianten NreAB(Q164A)C, NreAB(Q164H)C und NreB(Q164E)C in ihrem Wachstum getestet (Abb. 12). Die Varianten NreAB(Q164A)C und NreAB(Q164H)C wuchsen annähernd gleich, daher wurden nur NreAB(Q164A)C und NreAB(Q164E)C graphisch dargestellt.

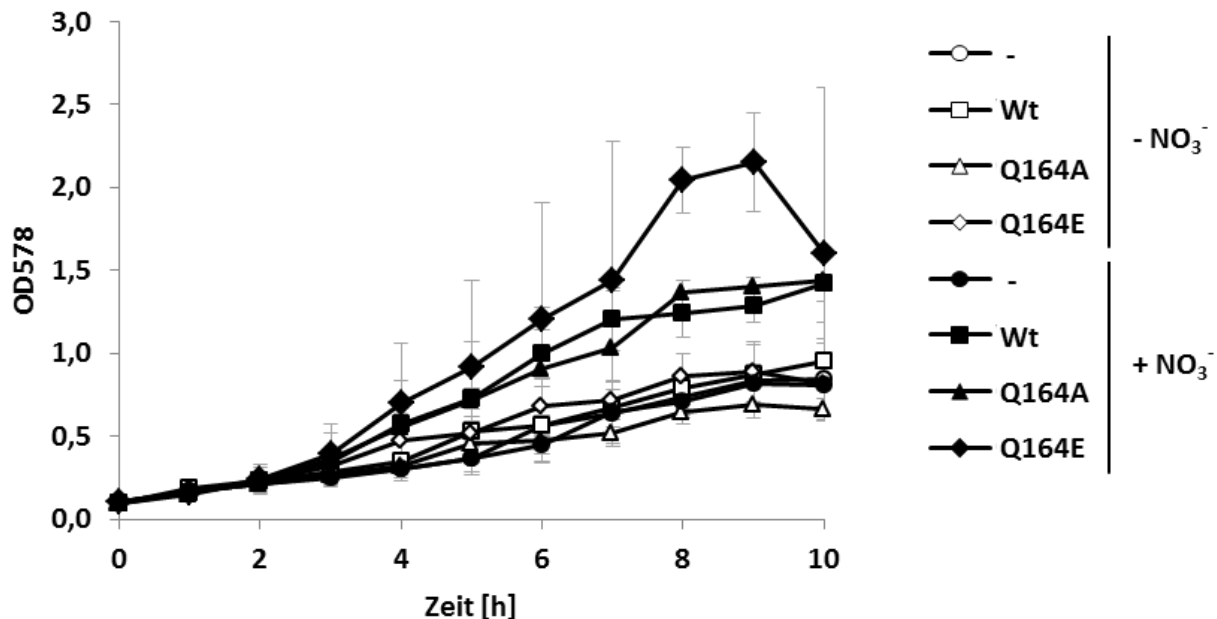


Abb. 12: **Anaerobes Wachstum von NreB(Q164)-Varianten.** Das anaerobe Wachstum erfolgte ab einer OD₅₇₈ von 0,1 in BM-Medium ohne (offene Symbole) bzw. mit 10 mM Nitrat (gefüllte Symbole) in *S. carnosus* (m1). Getestet wurde das Wachstum ohne NreABC (-; pRB473), mit wildtypischem NreABC (Wt; pMW418), NreAB(Q164A)C (Q164A; pMW2422) und NreAB(Q164E)C (Q164E; pMW2420). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Kulturen an.

Auch bei den Varianten von NreB(Q164) hatte Nitrat einen stimulierenden Effekt auf das anaerobe Wachstum. Bei der Variante NreB(Q164E) konnte ohne Nitrat kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden. In Anwesenheit von Nitrat wurde das Wachstum gegenüber dem Wildtyp gefördert. Der Wachstumsvorteil begann nach etwa 4 h. Die maximale OD₅₇₈ von 2,150 nach 9 h war um den Faktor 1,7 höher wie die zeitgleich erreichte OD₅₇₈ des Wildtyps und um den Faktor 2,4 höher wie die der Zucht ohne Nitrat. Danach sank die OD₅₇₈, war aber noch um den Faktor 1,1 höher wie die des Wildtyps. Der Stamm mit NreAB(Q164E)C wuchs ohne Nitrat deutlich langsamer als der Wildtyp und der Stamm ohne NreABC. Mit einer OD₅₇₈ von 0,661 nach 10 h war das Wachstum von

NreAB(Q164A)C von allen Kulturen ohne Nitrat am schwächsten. NreB(Q164A) hemmte demnach das Wachstum in Abwesenheit von Nitrat um den Faktor 1,4. Diese Hemmung wurde durch Nitrat aufgehoben. In Anwesenheit von Nitrat wuchs der Stamm mit der Variante NreB(Q164A) vergleichbar mit dem Wildtyp. Nach 10 h hatten beide Stämme eine ähnliche OD₅₇₈ erreicht.

4.3.3 Verdopplungszeit der Kulturen

Die Verdopplungszeit ist die Dauer, in der sich die Zellzahl einer Kultur verdoppelt. Grundlage der Berechnung ist das exponentielle Wachstum in einer halblogarithmischen Darstellung der Wachstumskurven.

Die aus den Wachstumskurven resultierenden Verdopplungszeiten unterstreichen wiederum die Bedeutung von NreABC und Nitrat für das anaerobe Wachstum von *S. carnosus* (Tab 6). Ohne NreABC war die Verdopplungszeit des Stammes *S. carnosus* m1 hoch und wurde durch die Expression von NreABC gesenkt. Nitrat verkürzte in allen Stämmen, die entweder wildtypisches NreABC oder eine Variante des NreB(DxxxQ)-Motivs exprimierten, die Verdopplungszeit (Faktor 1,3-2,3). Abhängig von der Art und Position der Substitution wuchsen die Varianten ohne Nitrat langsamer bzw. schneller als der Wildtyp. In allen Varianten lag aber die Verdopplungszeit beim anaeroben Wachstum mit Nitrat unter der Verdopplungszeit des Wildtyps.

Tab. 6: **Verdopplungszeit t_d der Kulturen nach anaerobem Wachstum mit und ohne 10 mM Nitrat.** Die Werte wurden aus den Wachstumskurven von folgenden Kulturen errechnet: *S. carnosus* m1 mit wildtypischem NreABC (Wt; pMW418) bzw. ohne NreABC (m1), NreAB(D160A)C (D160A; pMW2417), NreAB(D160S)C (D160S; pMW2421), NreAB(Q164A)C (Q164A; pMW2422), NreAB(Q164H)C (Q164H; pMW2418) und NreAB(Q164E)C (Q164E; pMW2420). Verdopplungszeit in min. Die Standardabweichungen ergeben sich aus drei unabhängigen Kulturen.

	Wt	m1	D160A	D160S	Q164A	Q164H	Q164E
N ₂	188 ± 8	235 ± 38	205 ± 31	144 ± 7	239 ± 69	232 ± 27	136 ± 28
N ₂ +Nitrat	111 ± 26	232 ± 25	95 ± 7	94 ± 12	103 ± 24	106 ± 16	102 ± 34

4.3.4 Alle Stämme mit regulatorischen Proteinen bilden Nitrit

S. carnosus reduziert Nitrat anaerob zu Nitrit. Die Transkription der an der Nitratreduktion beteiligten Proteine wird durch NreABC reguliert (Fedtke *et al.*, 2002, Nilkens *et al.*, 2014),

daher ist die Reduktion des Nitrats bzw. die Bildung von Nitrit als Zwischenprodukt ein Maß für die Aktivität der regulatorischen Proteine. Das gebildete Nitrit wird aus der Zelle exportiert und kann colorimetrisch im Medium gemessen werden (Fedtke *et al.*, 2002, Nicholas und Nason 1957).

Den Kulturen wurde zu Beginn der Zucht 10 mM Nitrat zugegeben und die Nitritkonzentration im Medium von zellfreien Kulturproben zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abb. 13). Der Wildtyp wuchs kontinuierlich, was mit einer kontinuierlichen Nitritbildung einherging. Nach 10 h hatte der Wildtyp mit 4,6 mM gebildetem Nitrit fast die Hälfte des zugesetzten Nitrats zu Nitrit umgesetzt (Abb. 13A). Im semiquantitativen Nitritnachweis mittels Nitratteststäbchen waren in den wildtypischen Zuchten ohne externe Zugabe von Nitrat nach 10 h bzw. 24 h weder Nitrat noch Nitrit nachweisbar. Nur bei vorheriger externer Nitratzugabe verfärbten sich sowohl das Nitratmessfeld wie auch die Nitritwarnzone (nicht gezeigt). Ohne NreABC wuchs *S. carnosus* deutlich langsamer und es konnte kein Nitrit nachgewiesen werden (Abb. 13B). Alle getesteten Varianten des DxxxQ-Motivs bildeten Nitrit in unterschiedlichem Maße. Die Varianten NreAB(D160A)C und NreAB(D160S)C wuchsen schneller als der Wildtyp, bildeten aber vergleichbare Konzentrationen an Nitrit (Abb. 13C+D). Bei den Varianten von NreB(Q164) war die Nitritkonzentration im Medium höher wie die des Wildtyps. NreAB(Q614A)C und NreAB(Q164H)C hatten mit 6,0 mM bzw. 5,8 mM Nitrit untereinander vergleichbare Nitritkonzentrationen gebildet (Abb. 13E; NreAB(Q164H)C nicht graphisch dargestellt). Die höchste Nitritkonzentration von 7,3 mM wurde im Stamm mit NreAB(Q163E)C gemessen (Abb. 13F).

4.4 Die Autophosphorylierung der NreB(DxxxQ)-Varianten

Die Sensorkinase NreB des NreBC-Zweikomponentensystems wird in Abwesenheit von Sauerstoff phosphoryliert (Fedtke *et al.*, 2002, Nilkens *et al.*, 2014). Unter Sauerstoffeinfluss nimmt die Autophosphorylierung ab; dies korreliert mit der Degradation des $[4Fe4S]^{2+}$ -Cluster (Müllner *et al.*, 2008). Dem konservierten Histidinrest H159, der auf Grund seiner Position vermutlich als Phosphoakzeptor dient, folgt das DxxxQ-Motiv. In dem Nitratsensor NarX von *E. coli* ist dieses Motiv für die Kinase- und Phosphatasefunktion von NarX wichtig (Huynh *et al.*, 2010).

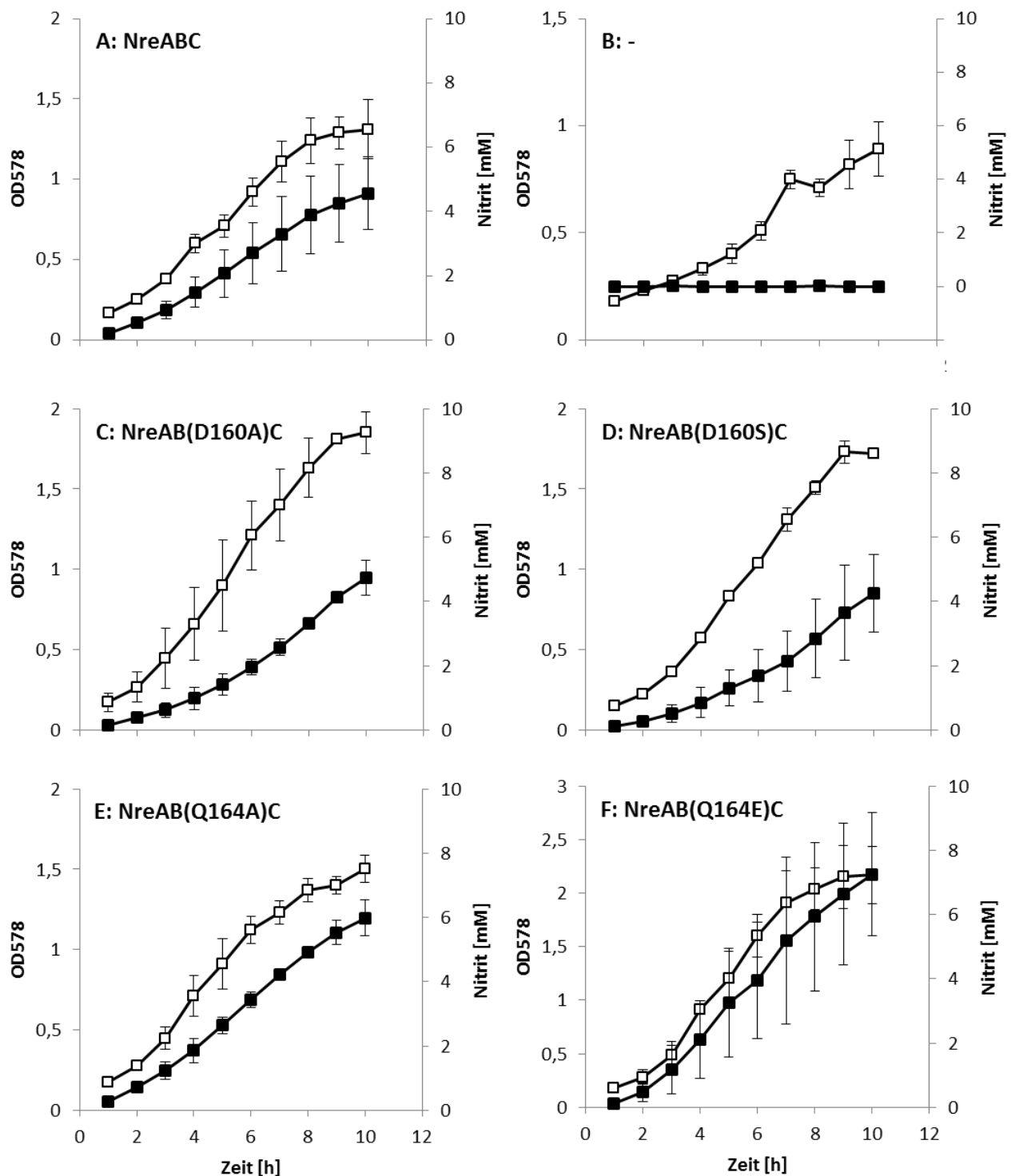


Abb. 13: **Nitritbildung von NreB(DxxxQ)-Varianten.** Die Bildung von Nitrit (gefülltes Quadrat) wurde in Kulturen gemessen, die anaerob in BM-Medium mit 10 mM Nitrat wuchsen (offenes Quadrat). Getestet wurde die Nitritbildung im Stamm *S. carnosus* m1 mit wildtypischem NreABC (A; pMW418), ohne NreABC (B; pRB473), mit NreAB(D160A)C (C; pMW2417), mit NreAB(D160S)C (D; pMW2421), mit NreAB(Q164A)C (E; pMW2422), mit NreAB(Q164H)C (F; pMW2418) und mit NreAB(Q164E)C (G; pMW2420). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von zwei unabhängigen Kulturen an.

Um zu untersuchen, ob das Motiv die NreB-Phosphorylierung beeinflusst, wurden NreB(DxxxQ)-Varianten anaerob isoliert und für *in vitro* Phosphorylierungen mit [γ - 33 P]-ATP eingesetzt. Getestet wurde die Phosphorylierung der Varianten NreB(D160A)-His₆, NreB(Q164A)-His₆ und NreB(Q164H)-His₆ und diese mit der Phosphorylierung von NreB-His₆ verglichen. Um die Phosphorylierung zu bestimmen, wurden SDS-PAGE Gele mit aufgetrenntem Protein auf einer PhosphorImager-Platte inkubiert. Die entstandene Schwärzung korreliert mit der Menge an phosphoryliertem Protein.

4.4.1 Die NreB(DxxxQ)-Varianten verringern die Autophosphorylierung

Die Versuche zur Autophosphorylierung von wildtypischem NreB-His₆ bzw. Varianten des DxxxQ-Motivs sollten zeigen, ob das DxxxQ-Motiv die Phosphorylierung von NreB beeinflusst. Dazu wurde isoliertes NreB-His₆ mit [γ - 33 P]-ATP inkubiert. Die zeitabhängigen Phosphorylierungslevel von NreB unterschieden sich (Abb. 14). Wildtypisches NreB-His₆ wurde über 300 min kontinuierlich phosphoryliert. Die Phosphorylierung von NreB-His₆ wurde 100 % gesetzt, was der maximal detektierten IOD entsprach.

NreB(D160A)-His₆ verursachte nach 18 h Inkubation auf der PhosphorImager-Platte keine Signale. Die Varianten NreB(Q164A)-His₆ und NreB(Q164H)-His₆ unterschieden sich nicht in ihrer Autophosphorylierung. Beide Varianten wurden kontinuierlich phosphoryliert, erreichten aber nur etwa 20-30 % der Phosphorylierung des wildtypischen NreB-His₆.

NreA moduliert nitratabhängig die Autophosphorylierung von NreB: NreA alleine hemmt die Autophosphorylierung, während NreA mit Nitrat die Autophosphorylierung von NreB stimuliert (Nilkens *et al.*, 2014). Der Einfluss von NreA, welches mit bzw. ohne Nitrat isoliert wurde, auf die Autophosphorylierung der NreB-Varianten wurde ebenfalls *in vitro* untersucht (Abb. 15). Zusammen mit wildtypischem NreB-His₆ kam es mit NreA ohne Nitrat nur zu einem schwachen Signal auf der PhosphorImager-Platte, sodass kaum phosphoryliertes NreB-His₆ vorlag. In Anwesenheit von NreA mit Nitrat entsprach die Autophosphorylierung zuerst der von NreB alleine. Erst bei längerer Inkubation (> 100 min) war die Autophosphorylierung geringer (Abb. 15A). Bei der Varianten NreB(D160A)-His₆ lag die Autophosphorylierung unabhängig von NreA bzw. NreA mit Nitrat unter 2 % (Abb. 15B). Die Autophosphorylierung von NreB(Q164H)-His₆ war gegenüber dem Wildtyp reduziert. Die gemeinsame Inkubation von NreB(Q164H)-His₆ mit NreA führte, vergleichbar wie bei

wildtypischem NreB-His₆, nur zu einem schwachen Signal. Zusammen mit NreA und Nitrat kam es zu einer Schwärzung der Phosphorimager-Platte (Abb. 15C).

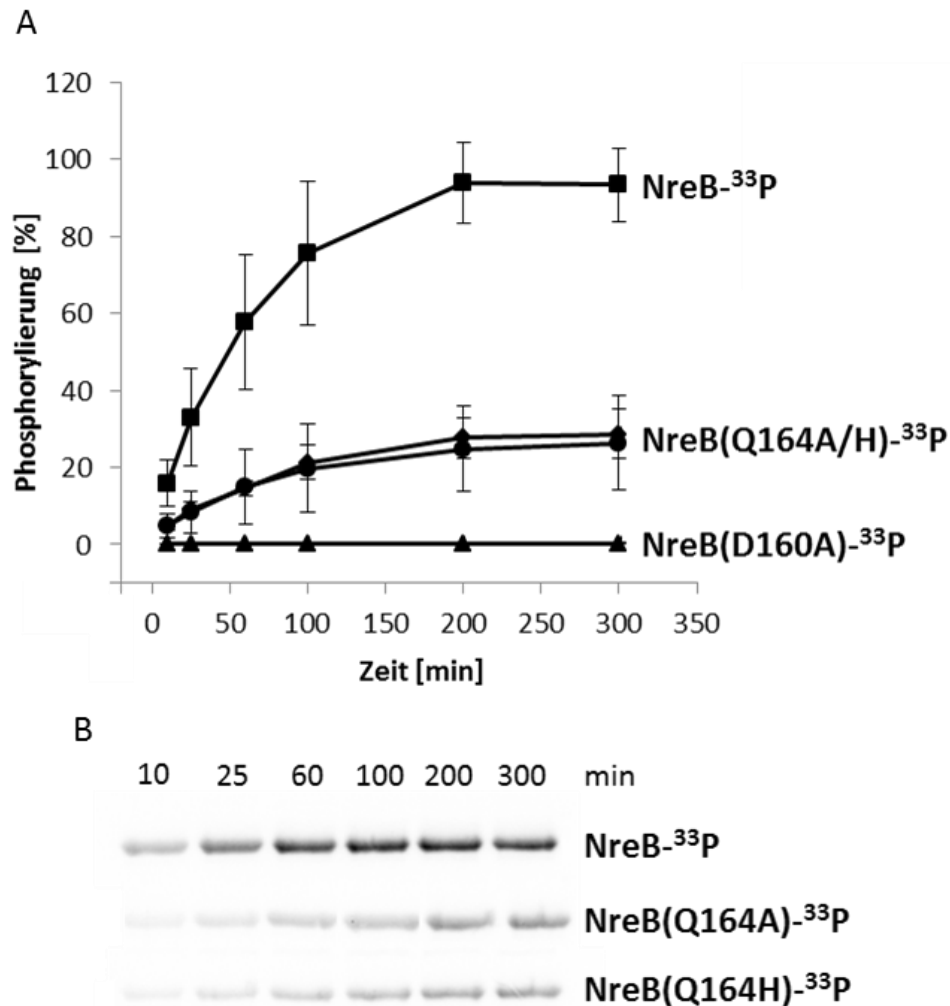


Abb. 14 **Autophosphorylierung von NreB(DxxxQ)-Varianten.** 15 μ M anaerob isoliertes NreB-His₆ wurde für 300 min mit [γ -³³P]-ATP (0,22 μ M, 7,3 TBq/mmol) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde 0,11 nmol Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele für 18 h auf einer Phosphorimager-Platte inkubiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an. Die Maximalwerte der jeweils gemessenen IOD von 2910,7; 2009,3 und 2124 wurde als 100 % definiert. A: Relative Phosphorylierung B: Autoradiographie.

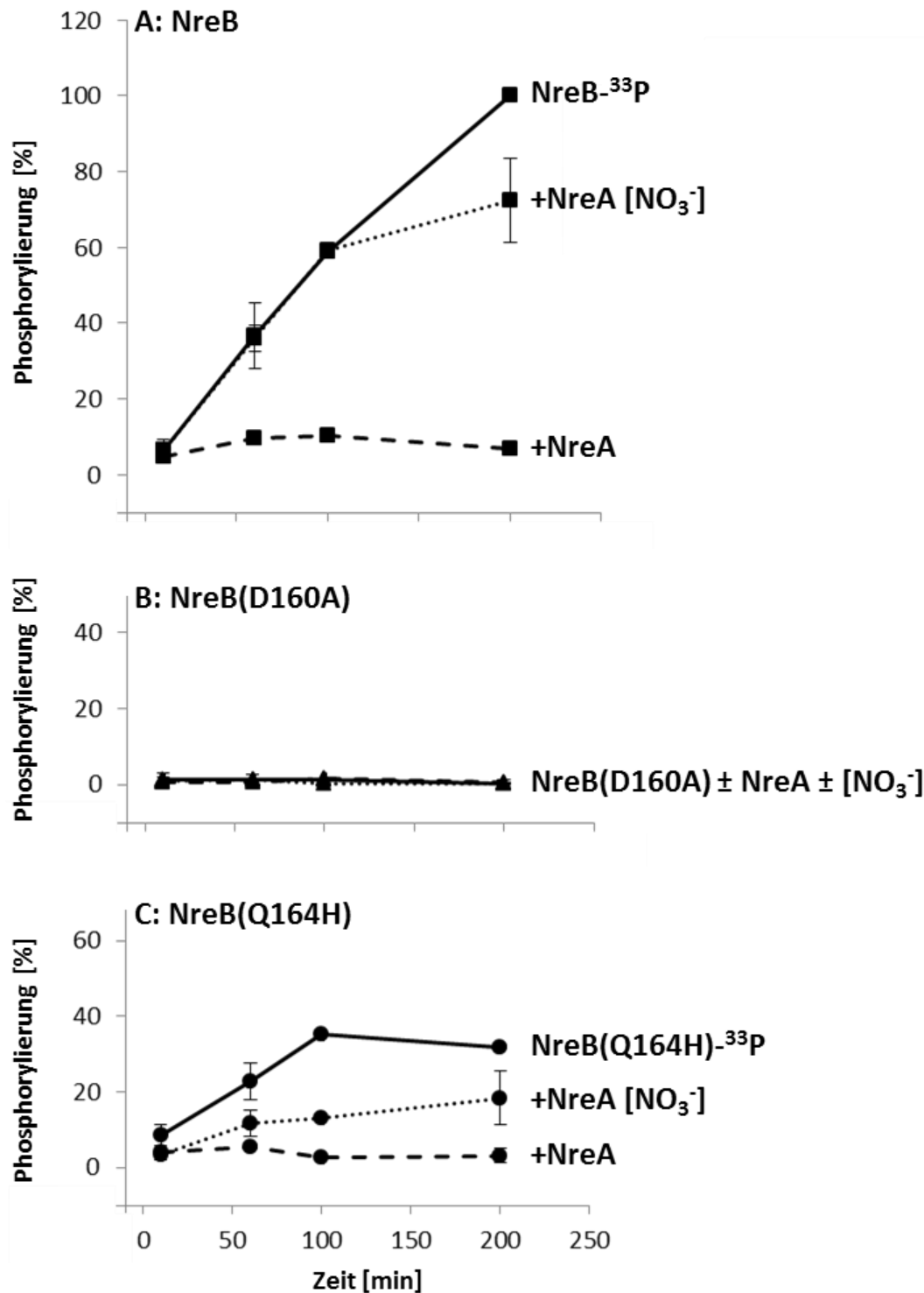


Abb. 15: **NreA- und NreA[NO₃⁻]-kontrollierte Autophosphorylierung von NreB(DxxxQ)-Varianten.** 10 µM anaerob isoliertes wildtypisches NreB-His₆ (A), NreB(D160A)-His₆ (B) oder NreB(Q164H)-His₆ (C) wurde einzeln (durchgezogen), mit 400 µM NreA-His₆ (gestrichelt) bzw. NreA[NO₃⁻]-His₆ (gepunktet) für 200 min mit [γ-³³P]-ATP (0,22 µM, 7,3 TBq/mmol) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde 0,1 nmol NreB-His₆ mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele für 20 h auf einer PhosphorImager-Platte inkubiert bzw. mittels Szintillationszähler gemessen. Die IOD von 2715,3 bzw. 24.120,4 dpm wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten an.

4.5 NreB(Q164)-Varianten übertragen die Phosphorylgruppe auf NreC

Innerhalb der Phosphorylierungskaskade ist der Phosphoryltransfer von der Sensorkinase auf den Antwortregulator der zweite Phosphorylierungsschritt nach der Autophosphorylierung der Sensorkinase. Für wildtypisches NreB-His₆ wurde bereits gezeigt, dass der Phosphoryltransfer von NreB auf NreC stattfindet und die beiden Proteine ein klassisches Zweikomponentensystem darstellen (Fedtke *et al.*, 2002, Nilkens *et al.*, 2014). Der Phosphorylrest wird von NreB(H159) auf NreC(D53) übertragen. Phosphoryliertes NreC aktiviert als Transkriptionsfaktor die Expression der an der Nitratatmung beteiligten Proteine (Fedtke *et al.*, 2002). Um die Fähigkeit der NreB(Q164)-Varianten zum Phosphoryltransfer auf NreC zu untersuchen, wurde wildtypisches NreB-His₆ bzw. die NreB(Q164)-His₆ Varianten und NreC-Strep isoliert. NreB-His₆ wurde wie oben beschrieben für 200 min mit [γ -³³P]-ATP autophosphoryliert und danach NreC-Strep zugegeben (Abb. 16). Da NreB(D160A)-His₆ keine Autophosphorylierungsaktivität zeigte, wurde diese Variante nicht im Phosphoryltransfer eingesetzt.

Nach 30 s Inkubation wurde annähernd das gesamte Phosphat von wildtypischem NreB-His₆ auf NreC-Strep übertragen. Nur ein minimaler Anteil von NreB-His₆ (<2 % verglichen mit 100 % vor NreC-Zugabe) blieb phosphoryliert, was durch die schwache Schwärzung im PhosphorImager erkenntlich wurde. 1 min nach dem Phosphoryltransfer wurde die höchste Phosphorylierung von NreC-Strep gemessen (Abb. 17). Bei den Varianten NreB(Q164A)-His₆ und NreB(Q164H)-His₆ erfolgte ebenfalls der Phosphoryltransfer, jedoch blieb ein größerer Anteil an phosphoryliertem mutiertem NreB-His₆ zurück als im Ansatz mit wildtypischem NreB (NreB(Q164A)-His₆: 10 % und NreB(Q164H)-His₆: 30 % verglichen mit 100 % vor NreC-Zugabe).

4.6 Die Dephosphorylierung von NreC-³³P ist bei den NreB(Q164)-Varianten verzögert

Nach Zugabe von NreC-Strep zu phosphoryliertem NreB-His₆ wird der Phosphorylrest von der Sensorkinase auf den Antwortregulator übertragen (vgl. Abb. 16). In Abb. 17 ist gezeigt, wie sich der Phosphorylierungslevel von NreC-³³P innerhalb von 30 min nach dem Phosphoryltransfer verändert. Unter den experimentellen Bedingungen lag weiterhin NreB und [γ -³³P]-ATP (bzw. ADP) vor. Unter diesen Bedingungen sank die Phosphorylierung von

NreC bei Anwesenheit von wildtypischem NreB innerhalb von 30 min auf 22 % des Ausgangswertes. In Anwesenheit von NreB(Q164A) war die Abnahme vergleichbar; nach 30 min lagen aber nur noch 29 % phosphoryliertes NreC vor. Zusammen mit der Variante NreB(Q164H) war die Abnahme an phosphoryliertem NreC am schwächsten. Innerhalb von 30 min nach dem Phosphoryltransfer wurde nur etwa die Hälfte des ursprünglich phosphorylierten Antwortregulators dephosphoryliert.

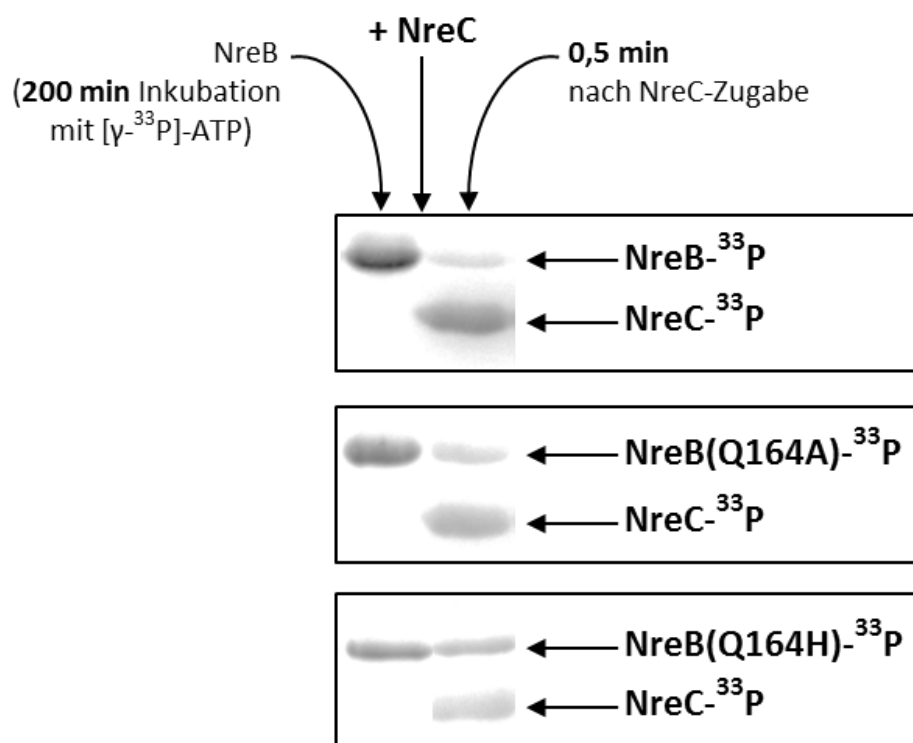


Abb. 16: **Phosphoryltransfer von NreB(Q164)-Varianten auf NreC: Autoradiographie.** 30 μ M wildtypisches NreB-His₆ bzw. NreB(Q164)-Varianten wurden mit $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ autophosphoryliert. Nach 200 min wurde 30 μ M NreC-Strep hinzugegeben. Die SDS-Gele wurden mit 0,2 nmol NreB (vor NreC-Zugabe) bzw. 0,27 nmol NreB (nach NreC-Zugabe) und 0,48 nmol NreC für 20 h auf der Phosphorimager-Platte inkubiert. Um die schwächeren Signale erkennbar zu machen, wurden der Kontrast und die Helligkeit verändert (Kontrast -50 %; Helligkeit +2 %). Das unveränderte Radiogramm befindet sich im Anhang (Abb. I-1).

Die Varianten von NreB(Q164) beeinflussen die Dephosphorylierung von NreC-³³P. Der Versuchsaufbau lässt keine Rückschlüsse auf eine mögliche Sensor-unabhängige NreC-Dephosphorylierung oder über deren Geschwindigkeit zu. Eine intrinsische Phosphataseaktivität von NreC kann nicht untersucht werden. Auch der Einfluss einer erneuten Phosphorylierung von NreC durch das im Ansatz noch enthaltene $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ zusammen mit NreB kann nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde NreC nach dem

Phosphoryltransfer von NreB separiert und die Dephosphorylierung von NreC- ^{33}P untersucht.

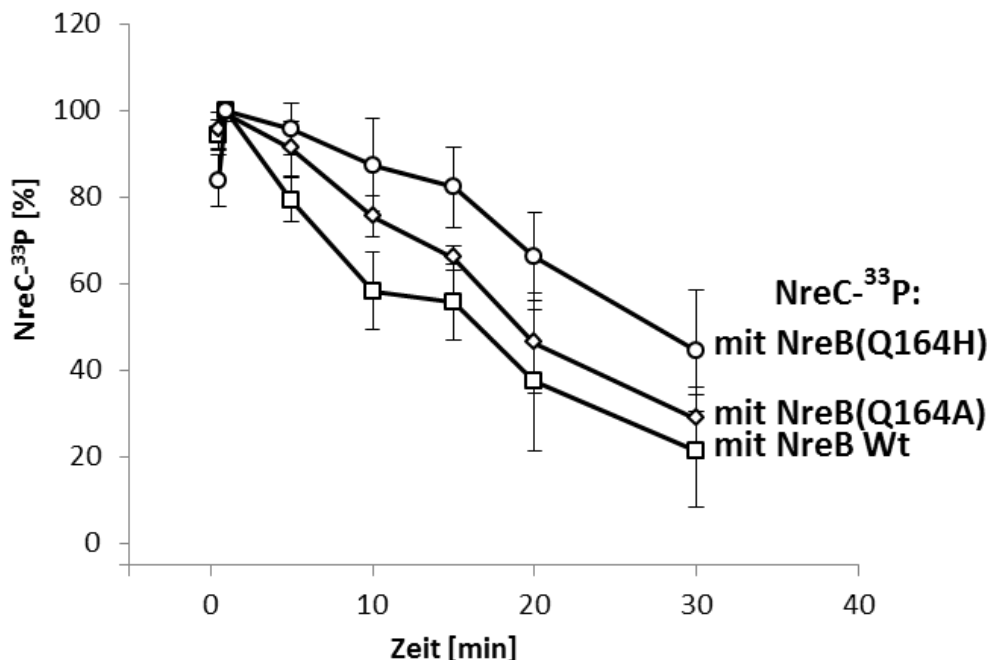


Abb. 17: **Dephosphorylierung von NreC- ^{33}P .** Nach dem Phosphoryltransfer wurde für 30 min die Abnahme der Phosphorylierung von NreC- ^{33}P gemessen. 0,27 nmol NreB-His₆ und 0,48 nmol NreC-Strep wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und für 20 h auf der PhosphorImager-Platte inkubiert. Die relative Phosphorylierung von NreC- ^{33}P in Anwesenheit von wildtypischem NreB-His₆ (Quadrat), NreB(Q164A)-His₆ (Diamant) oder NreB(Q164H)-His₆ (Kreis) wurde bestimmt. Die maximal gemessene IOD für jeden Ansatz wurde als 100 % definiert (NreC- ^{33}P mit Wt: 542,32; 1182,5; 1203,6 NreC- ^{33}P mit NreB(Q164A): 112,63; 418,88; 524,1 NreC- ^{33}P mit NreB(Q164H): 138,63; 219,6; 324,88). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an.

4.7 Stabilität von NreC- ^{33}P

In den bisherigen Versuchen zur Dephosphorylierung von NreC- ^{33}P wurde NreC durch den Phosphoryltransfer durch bereits vorher phosphoryliertes NreB phosphoryliert. In dem Versuchsansatz lag dadurch phosphoryliertes NreC in einem Gemisch zusammen mit nicht-phosphoryliertem NreC, phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem NreB, ATP, $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$, ADP und ^{33}P vor. Der Einfluss von phosphoryliertem NreB durch noch vorhandenes $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ auf die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von NreC kann nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde durch den Einsatz von Strep-Tactin-Spin Columns (IBA) ein alternativer Versuchsansatz für die Dephosphorylierung verwendet. NreC-Strep wurde zuerst durch wildtypisches NreB- ^{33}P phosphoryliert und dann über den Strep-tag mit

den Strep-Tactin-Spin Columns von NreB-His₆ getrennt. NreC-Strep bindet spezifisch an die immobilisierte Strep-Tactin-Matrix der Säulen, während NreB-His₆ die Matrix passiert. NreC-Strep wurde mittels Biotin spezifisch eluiert. Biotin besitzt eine höhere Affinität zur Matrix und verdrängt das Strep-getaggte Protein. In unabhängigen Wiederholungen wurden Proteinmengen zwischen 42-56 µg und 94-98 µg eluiert.

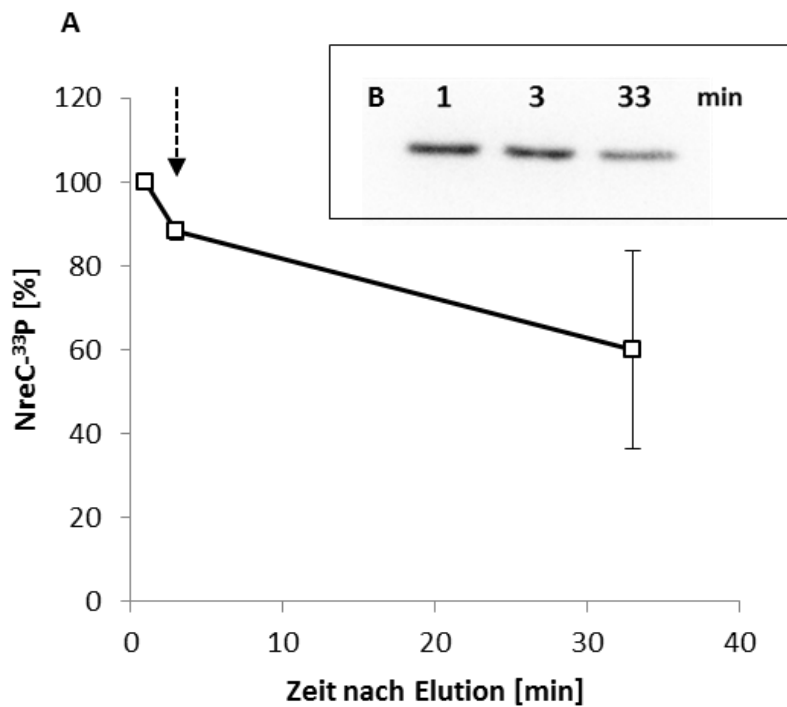


Abb. 18: **Stabilität von NreC-³³P im Eluat.** Nach dem Phosphoryltransfer wurde NreC-Strep mittels Strep-Tactin® Spin Columns (IBA) von NreB-His₆ separiert. Die Probennahme aus dem Eluat erfolgte 1 min, 3 min und 33 min nach der Elution. 0,03-0,05 nmol NreC-Strep wurde für 24 h auf der PhosphorImager-Platte inkubiert und die Stabilität von NreC-³³P wurde bestimmt. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt an, ab dem NreC-³³P in den folgenden Phosphatase-Assays mit NreB-His₆ inkubiert wird. Die maximale gemessene IOD von 1283,7, 994,21 und 282,13 in drei unabhängigen Experimenten wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an. A: Relative Phosphorylierung B: Autoradiographie.

Um die Stabilität der Proteinphosphorylierung im Eluat zu testen, wurden parallel zu den Phosphataseversuchen Proben des Eluats 1 min, 3 min und 33 min nach der Elution von NreC-³³P genommen und mittels PhosphorImager-Platte auf die Stabilität von NreC-³³P hin untersucht. 100 % Phosphorylierung 1 min nach der Elution entsprach der maximalen IOD, die durch die phosphorylierten Proteine erreicht wurde (Abb. 18). Nach weiteren 2 min war noch 88 % NreC-Strep phosphoryliert. Bei den Phosphataseversuchen erfolgte zu diesem

Zeitpunkt die Zugabe von wildtypischem NreB-His₆ bzw. Varianten zu NreC-³³P. 33 min nach der Elution wurde eine Phosphorylierung von 60 % gemessen.

4.8 NreC-³³P zeigt NreB-unterstützte intrinsische Phosphataseaktivität

Für die Dephosphorylierung eines Antwortregulators sind verschiedene Mechanismen denkbar: a) der Antwortregulator besitzt eine intrinsische Autophosphataseaktivität, b) der Antwortregulator wird Sensor-abhängig dephosphoryliert, c) ein weiteres Protein beeinflusst die Dephosphorylierung.

Die intrinsische Autophosphataseaktivität und/oder eine NreB-abhängige NreC-Dephosphorylierung wurden in einem Phosphatase-Assay untersucht, in dem NreC-³³P mit verschiedenen Konzentrationen an NreB inkubiert wurde (Abb. 19).

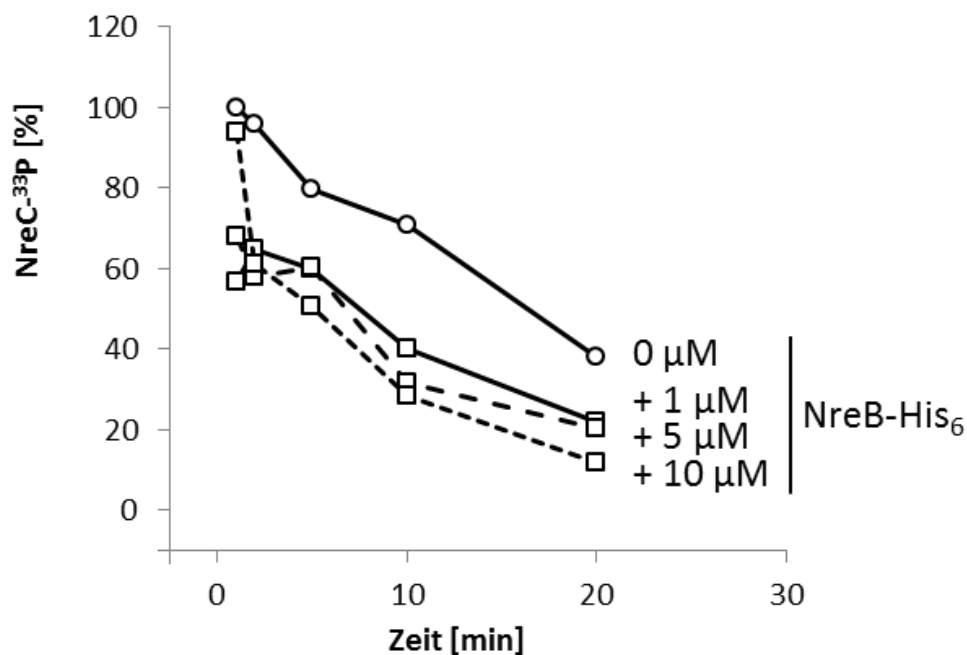


Abb. 19: **NreC-³³P Dephosphorylierung durch unterschiedliche Konzentrationen von wildtypischem NreB-His₆.** Nach Abtrennung von NreC-³³P mittels Strep-Tactin® Spin Columns (IBA) wurde NreC-³³P mit 1 μM (durchgezogen), 5 μM (gestrichelt) oder 10 μM (gepunktet) wildtypischem NreB-His₆ (Quadrat) bzw. Puffer C (Kreis, 0 μM) inkubiert und für 48 h auf der PhosphorImager-Platte inkubiert. Die IOD von 243,02 zum Zeitpunkt t=1 min mit Zugabe von Puffer C wurde als 100 % definiert.

Für die Stabilität von NreC-³³P ohne NreB wurde statt der Sensorkinase der NreB-Elutionspuffer C zu NreC gegeben. In allen Versuchsansätzen nahm die NreC-³³P-Phosphorylierung kontinuierlich ab. Ohne externe Zugabe von NreB sank der Anteil an NreC-

^{33}P auf etwa 40 % des ursprünglichen Wertes. Durch Zugabe von 1-10 μM NreB wurde die Dephosphorylierung verstärkt. Die Konzentration an NreB korrelierte mit der verstärkten Dephosphorylierung. Da bereits die Zugabe von 1 μM NreB einen deutlichen Effekt auf die Dephosphorylierung hatte, wurde bei den folgenden Versuchen ebenfalls 1 μM wildtypisches NreB bzw. die NreB(DxxxQ)-Varianten mit NreC- ^{33}P inkubiert.

NreB konnte durch die Strep-Tactin Spin Columns nicht vollständig abgetrennt werden. Die Dephosphorylierung von NreC „ohne Sensor“ kann auch vom restlichen NreB katalysiert worden sein. Dieser Aspekt kann bei den folgenden Phosphatase-Assays nicht ausgeschlossen werden.

4.9 Dephosphorylierung von NreC- ^{33}P durch NreB(DxxxQ)-Varianten

Um den Einfluss des NreB(DxxxQ)-Motivs auf die Dephosphorylierung von NreC zu untersuchen, wurden die Varianten NreB(D160A)-His₆ und NreB(Q164H)-His₆ im Phosphatase-Assay getestet (Abb. 20). Die Varianten, NreB-His₆ bzw. Elutionspuffer wurden 3 min nach der Elution von NreC- ^{33}P von den Strep-Tactin Spin Columns mit NreC- ^{33}P inkubiert (Pfeil). Zum Zeitpunkt der NreB-Zugabe lag NreC zu 87 % phosphoryliert vor im Vergleich zu der maximalen Phosphorylierung 1 min nach der Elution. Der Verlauf in der Abnahme der radioaktiven NreC-Phosphorylierung ähnelte sich unabhängig von Zugabe von Puffer bzw. Sensor. Unmittelbar nach deren Zugabe kam es zu einer rapiden Abnahme an NreC- ^{33}P gefolgt von einer mehr oder weniger ausgeprägten schwachen Zunahme. Durch die Zugabe von Elutionspuffer (Abb. 20A) bzw. NreB(D160A)-His₆ (Abb. 20C) nahm der Anteil an NreC- ^{33}P erneut ab und lag nach 30 min bei 27 % bzw. 34 %. In Anwesenheit von NreB(Q164H)-His₆ (Abb. 20D) blieb die Menge an NreC- ^{33}P zuerst annähernd konstant; nach 10 min nahm sie ebenfalls ab. Zusammen mit wildtypischem NreB-His₆ (Abb. 20B) blieb NreC- ^{33}P über die gesamte Versuchsdauer annähernd konstant und lag nach 30 min bei einem mit NreB(Q164H)-His₆ vergleichbaren Wert.

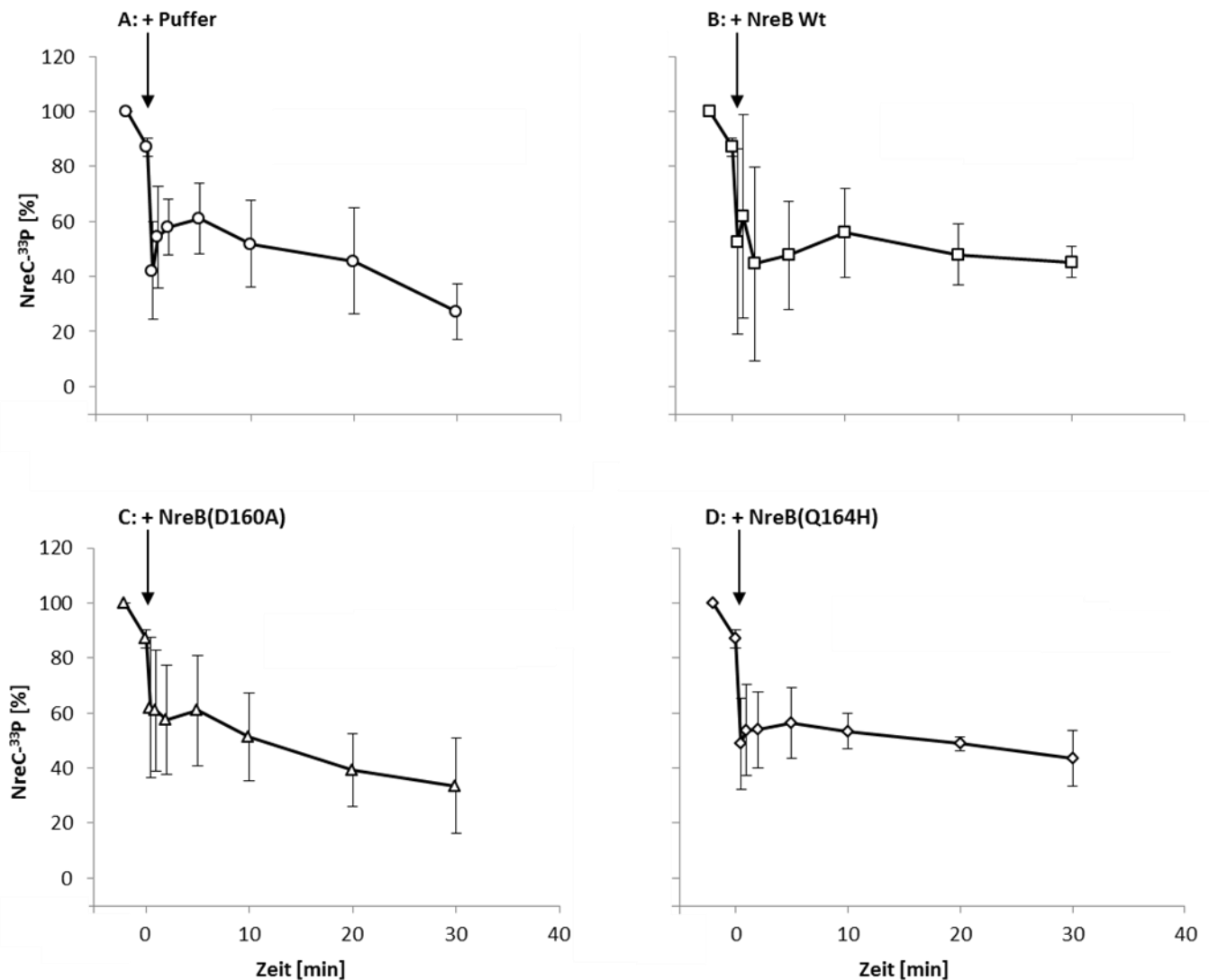


Abb. 20: **Dephosphorylierung von NreC-³³P**. 2,3-5 μ M NreC-Strep wurde mit 1 μ M wildtypischem NreB-His₆ (B, Quadrat), NreB(D160A)-His₆ (C, Dreieck), NreB(Q164H)-His₆ (D, Diamant) oder Puffer C (A, Kreis) 3 min nach der Elution (Pfeil) inkubiert. 0,02-0,05 nmol NreC-Strep wurde für 24 h auf der PhosphorImager-Platte inkubiert. Die maximal gemessene IOD zum Zeitpunkt t=1 min von 282,13, 335,65 und 1283,65 in drei unabhängigen Experimenten wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an.

In *S. carnosus* wird die Expression der Gene der Nitratatmung durch das Zweikomponentensystem NreBC zusammen mit dem Nitratsensor NreA reguliert. NreA moduliert Nitrat-abhängig die Autophosphorylierung von NreB (Fedtke *et al.*, 2002; Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). Inwiefern NreA auch einen Einfluss auf die Dephosphorylierung von NreC hat, wurde getestet. NreC-³³P wurde zusammen mit NreB-His₆ bzw. der Varianten NreB(Q164H)-His₆ ohne NreA, mit NreA bzw. mit NreA isoliert mit Nitrat inkubiert (Abb. 21). Mit wildtypischem NreB-His₆ hatte NreA bzw. NreA mit Nitrat keinen Einfluss auf die Dephosphorylierung (Abb. 21A).

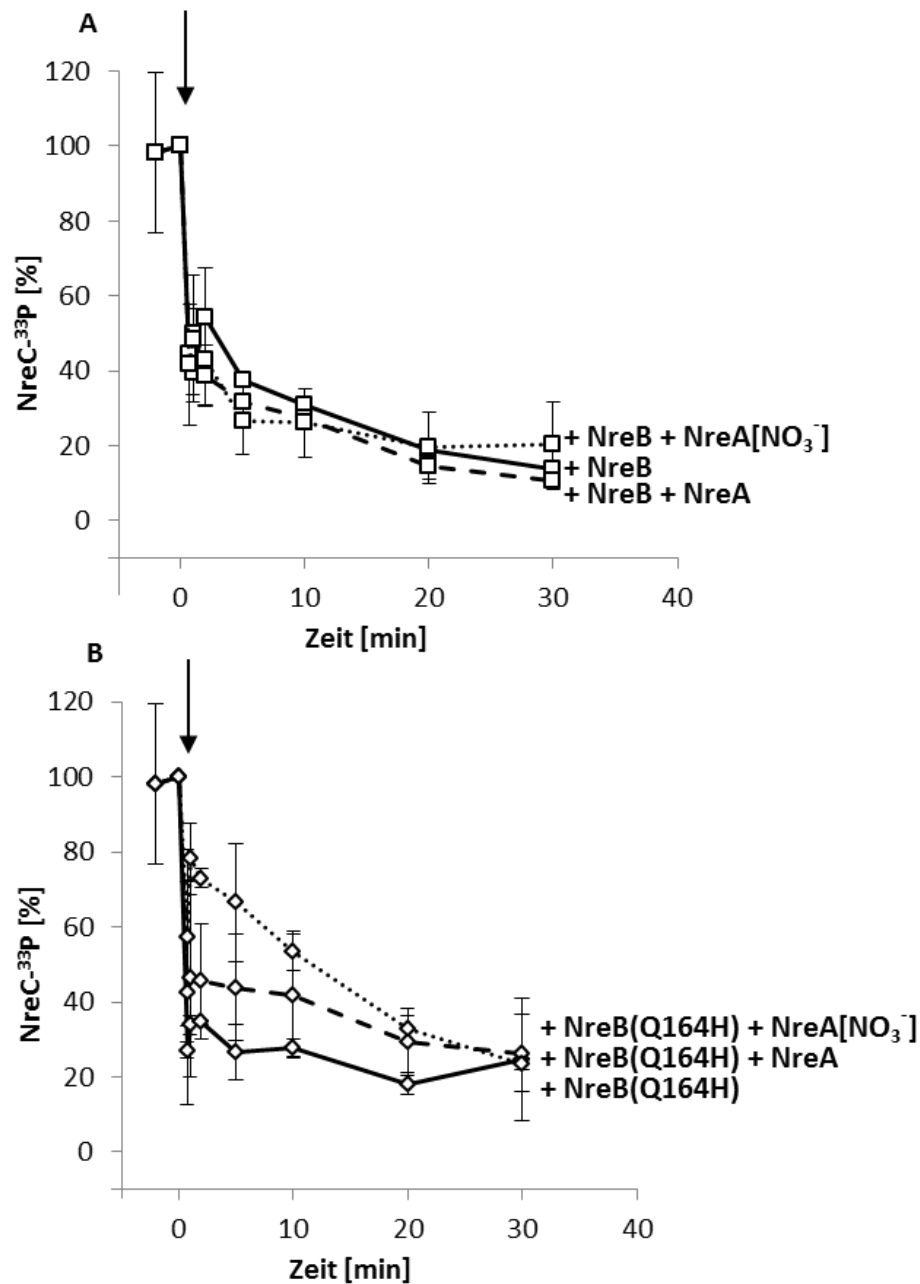


Abb. 21: **Einfluss von NreA und NreA[NO₃⁻] auf die Dephosphorylierung von NreC-³³P.** 2,2-7,4 μ M NreC-Strep wurde mit 1 μ M wildtypischem NreB-His₆ (A, Quadrat) oder NreB(Q164H)-His₆ (B, Diamant) 3 min nach der Elution (Pfeil) inkubiert. NreB-His₆ wurde einzeln (durchgezogen) oder zusammen mit 40 μ M NreA-His₆ (gestrichelt) oder NreA[NO₃⁻]-His₆ (gepunktet) inkubiert. 0,02-0,07 nmol NreC-Strep wurde für 24 h auf der PhosphorImager-Platte inkubiert. Die maximal gemessene IOD zum Zeitpunkt der Zugabe (Pfeil) von 681,15 und 879,36 wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten an.

Unter allen drei Bedingungen kam es zu einer vergleichbaren Abnahme der NreC-Phosphorylierung. Zusammen mit NreB(Q164H)-His₆ hatte NreA einen deutlichen Einfluss (Abb. 21B). Die Dephosphorylierung, die bei alleiniger Anwesenheit von NreB(Q164H)-His₆

zu beobachten war, wurde durch NreA verlangsamt. NreA, welches mit Nitrat isoliert wurde, verstärkte diesen Effekt nochmals. Diese Hemmung ist innerhalb der ersten 10 min nach Zugabe von NreB(Q164H), NreA und NreA mit Nitrat am deutlichsten.

4.10 Charakterisierung von NreB(H159Q)

Die Sensor NreB wird wie für Histidinkinasen typisch an einem Histidinrest phosphoryliert. Auf Grund seiner Lage in der Kinasedomäne und seiner Konservierung wurde der Histidinrest H159 als Phosphoakzeptor angenommen (Fedtke *et al.*, 2002). Experimentelle Ergebnisse dazu fehlen bisher. Daher wurde die Variante NreB(H159Q) erstellt, deren Aktivität in der Genexpression der Nitratreduktase, dem anaeroben Wachstum von *S. carnosus* und der Nitritbildung untersucht wurde. Phosphorylierungsversuche konnten nicht durchgeführt werden, da die Variante nicht erfolgreich für die Proteinüberproduktion und -isolierung in den Stamm *S. carnosus* m1 kloniert werden konnte.

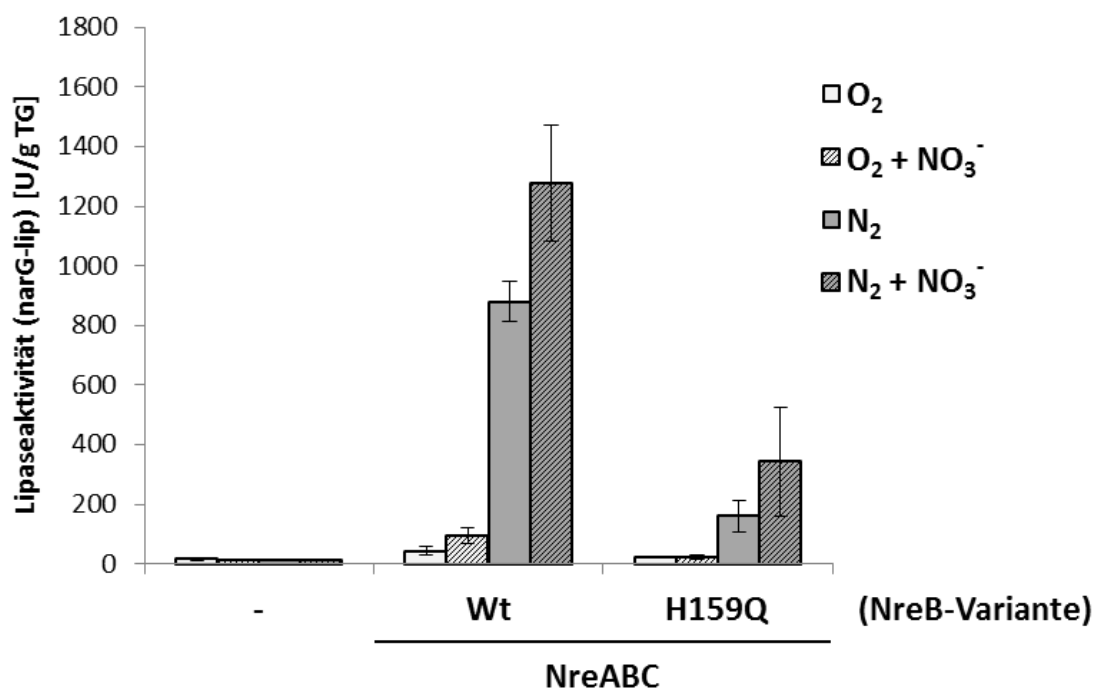


Abb. 22: Einfluss von NreB(H159Q) auf die Expression von *narG-lip*. Getestet wurde die *narG-lip*-Expression in *S. carnosus* m1 in Abwesenheit von NreABC (-; pMW1001), mit wildtypischem NreABC (Wt; pMW1040) und mit NreAB(H159Q)C (H159Q; pMW2342). Die Bakterien wuchsen aerob bzw. anaerob ohne bzw. mit 10 mM Nitrat in BML-Medium. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von drei unabhängigen Kulturen mit jeweils drei Messungen an.

4.10.1 NreAB(H159Q)C bewirkt eine niedrige anaerobe Lipaseaktivität

Die NreB(H159Q)-Variante zeigte aerob eine sehr niedrige Aktivität in der Expression des *narG*-Gens, die nur geringfügig über der Hintergrundaktivität bei Abwesenheit von NreABC lag (Abb. 22). Anaerobiose führte zu einer geringen Aktivitätssteigerung, die in Anwesenheit von Nitrat weiter zunahm. Insgesamt war die Expressionsstärke jedoch gering und betrug maximal 27 % der Aktivität von Wildtyp-NreB.

4.10.2 Die Variante NreB(H159Q) hemmt das Wachstum von *S. carnosus*

Das Wachstum von *S. carnosus* wurde durch die Varianten NreB(H159Q) gehemmt (Abb. 23); *S. carnosus* m1 mit NreAB(H159Q)C wuchs ohne Nitrat vergleichbar mit den Stämmen *S. carnosus* m1 ohne NreABC und *S. carnosus* m1 mit wildtypischem NreABC ohne Nitratverfügbarkeit. Die Stimulierung des Wachstums durch Nitrat blieb erhalten, wobei die Stimulierung um den Faktor 1,3 etwas niedriger war wie der bei wildtypischem NreABC (Faktor 1,5). Die schwächere Stimulierung durch Nitrat spiegelte sich ebenfalls in der Verdopplungszeit wider: Die Verdopplungszeit ohne Nitrat lag bei 181 ± 6 min ohne Nitrat und ähnelte damit der Verdopplungszeit von wildtypischem NreABC (188 ± 8 min). Mit Nitrat lag sie bei 149 ± 26 min und damit über der von wildtypischem NreABC (111 ± 26 min).

4.10.3 NreAB(H159Q)C bildet bei anaerobem Wachstum kein Nitrit

Im *narG-lip* Reportergensystem konnte für den Stamm mit NreAB(H159Q) eine schwache Aktivität unter anaeroben Bedingungen gemessen werden, die durch Nitrat nochmals stimuliert wurde. Dies entspricht einem reduzierten wildtypischen Phänotyp. Dennoch bildete der Stamm *S. carnosus* m1 mit NreAB(H159Q) kein Nitrit bei Verfügbarkeit von Nitrat und anaerobem Wachstum (Abb. 24).

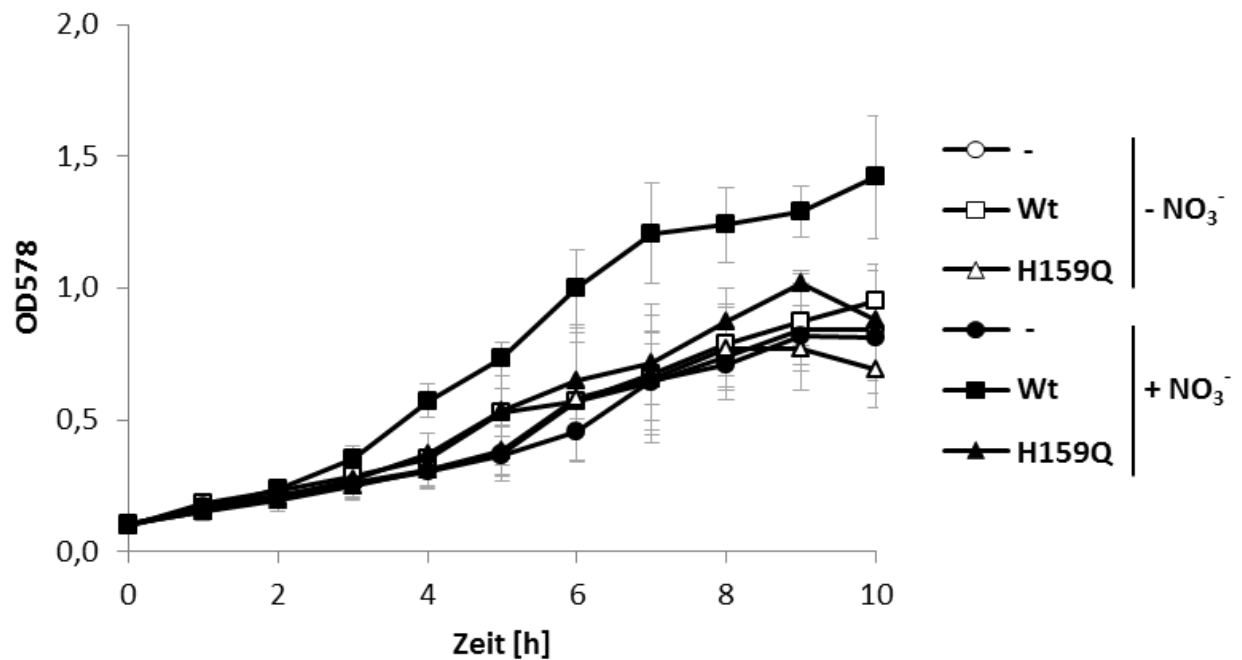


Abb 23. **Anaerobes Wachstum von *S. carnosus* m1 mit NreAB(H159Q)C.** Das anaerobe Wachstum wurde ab einer OD₅₇₈ von 0,1 in BM-Medium ohne (offene Symbole) bzw. mit 10 mM Nitrat (gefüllte Symbole) in *S. carnosus* m1 durchgeführt. Getestet wurde das Wachstum in dem Stamm ohne NreABC (-; pRB473), mit wildtypischem NreABC (Wt; pMW418) und NreAB(H159Q)C (H159Q; pMW2419). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Kulturen an.

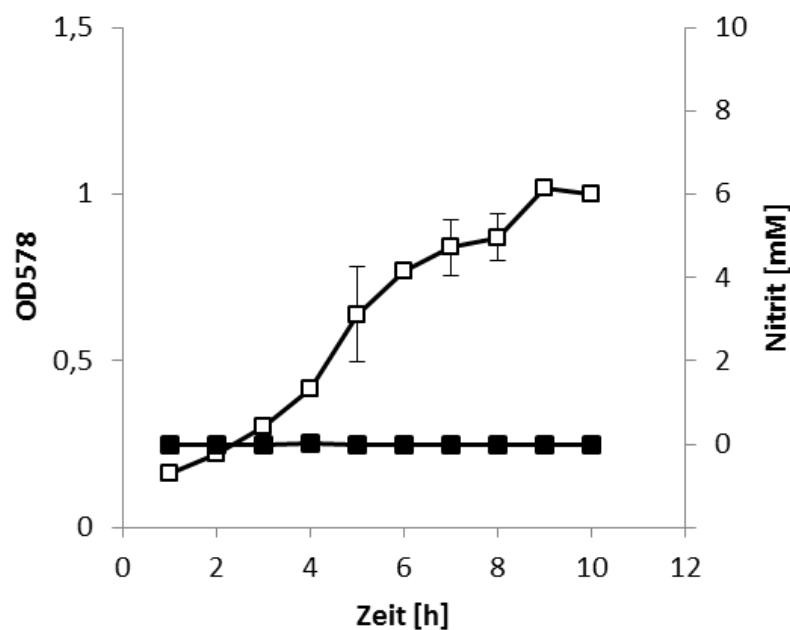


Abb 24. **Nitritbildung in *S. carnosus* mit NreB(H159Q).** Die Bildung von Nitrit wurde in Kulturen gemessen, die anaerob in BM-Medium mit 10 mM Nitrat wuchsen. Getestet wurde der Stamm *S. carnosus* m1 mit NreAB(H159Q)C (pMW2419). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von zwei unabhängigen Kulturen an.

4.11 Aktivität des Antwortregulators NreC ohne NreAB

In Abwesenheit von Sauerstoff wird der Antwortregulator NreC durch NreB phosphoryliert. Von anderen Antwortregulatoren ist bekannt, dass sie in gewissen Umfang auch unabhängig von der spezifischen Sensorkinase phosphoryliert werden (Lukat *et al.*, 1992; Noriega *et al.*, 2010; Hentschel *et al.*, 2014). In *Corynebacterium glutamicum* regulieren die homologen Zweikomponentensysteme HrrSA und ChrSA die Häm-Homöostase. Der Cross-talk zwischen den Sensorkinasen und ihren nicht-spezifischen Antwortregulatoren führt zu deren unspezifischen Aktivierung (Hentschel *et al.*, 2014). Antwortregulatoren können Sensor-unabhängig auch von niedermolekularen Phosphodonoren wie Acetylphosphat oder Carbamoylphosphat phosphoryliert werden (Lukat *et al.*, 1992). Für Untersuchungen, ob NreC auch in Abwesenheit von NreB phosphoryliert und damit für die Expression der Nitratreduktase aktiviert werden kann, wurde ein Reportergenplasmid konstruiert, das neben der *narG-lip* Reportergenfusion noch für NreC kodiert. Dessen Expression steht unter Kontrolle des nativen *nreABC*-Promotors.

In *S. carnosus* m1, welches nur NreC exprimiert ohne den Nitratsensor NreA und die Sensorkinase NreB, wurde unter den vier getesteten Wachstumsbedingungen nur eine geringe Lipaseaktivität gemessen (Abb. 25). Die Aktivitäten waren nur minimal höher wie im Stamm *S. carnosus* m1 ohne NreABC. NreC zeigt also *in vivo* keine NreB-unabhängige Aktivierung.

4.12 Phosphorylierung von NreC mit Carbamoylphosphat

In vivo wurde mit dem Reportgensystem keine Aktivität des Antwortregulators NreC in Abwesenheit der Sensorkinase NreB gemessen. Antwortregulatoren können auch *in vitro* durch niedermolekulare Phosphodonoren phosphoryliert werden (Drapal und Sawers, 1995). Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgt oft im EMSA-Assay. Für NreC wurde die Phosphorylierung mittels SDS-PAGE mit Phos-tag untersucht (Abb. 27). Phos-tag ist ein Phospho-affines Reagenz, das mit bivalenten Kationen Phosphatgruppen bindet. In der SDS-PAGE bewirkt der Phos-tag eine Retardierung von phosphorylierten Proteinen. Diese äußert sich in einem Mobilitätsshift, durch den phosphorylierte Proteine von nicht-phosphorylierten Proteinen unterschieden werden können.

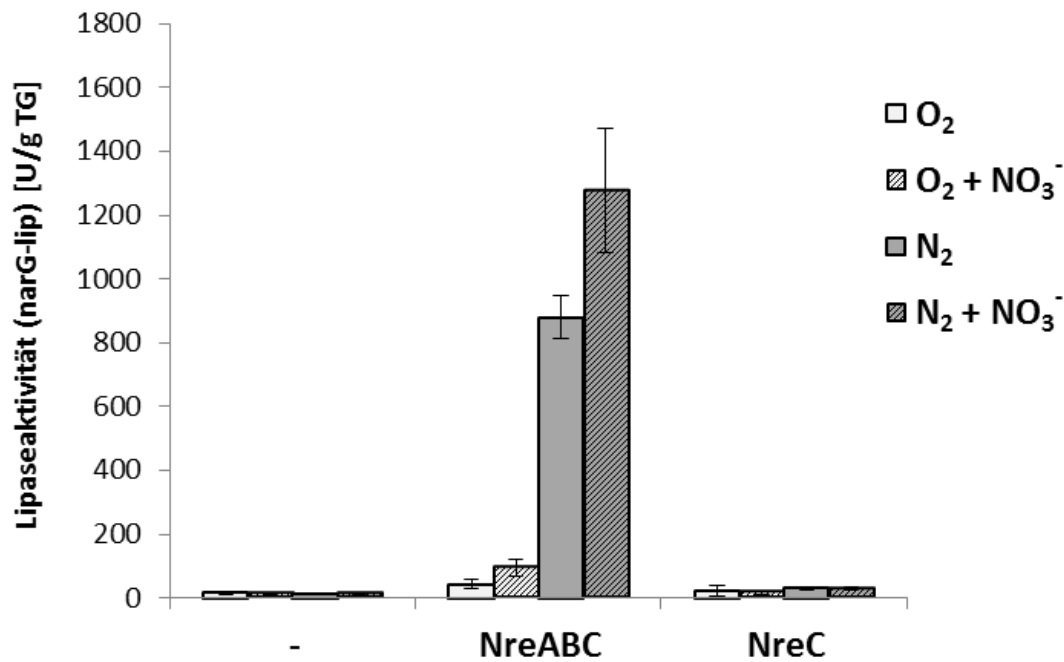


Abb. 25: **Expression der Nitratatmung in Abwesenheit von NreAB.** Getestet wurde die *narG-lip*-Expression von *S. carnosus* (m1) in Abwesenheit von NreABC (-; pMW1001), wildtypischem NreABC (Wt; pMW1040) und der Deletion von NreAB (NreC; pMW2544). Die Bakterien wuchsen aerob bzw. anaerob ohne bzw. mit 10 mM Nitrat in BML-Medium. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von drei unabhängigen Kulturen mit jeweils drei Messungen an.

Als Kontrolle der Phosphorylierung und dessen Nachweis mittels Phos-tag wurde der Antwortregulator ArcA isoliert und phosphoryliert wie zuvor beschrieben (Wackwitz 1999). ArcA-His₆ wurde ohne oder mit 50 mM Carbamoylphosphat für insgesamt 2 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen, um den Fortschritt der Phosphorylierung zu untersuchen (Abb. 26). Ohne Carbamoylphosphat wurde eine prominente Bande von M_r ~35 kDa detektiert. Mit zunehmender Inkubationsdauer mit Carbamoylphosphat wurde eine zweite Bande von M_r ~40 kDa detektiert. Die Bande, die phosphoryliertes ArcA-His₆ (ArcA-P) repräsentiert, trat nach etwa 5 min auf. Ab einer Inkubationsdauer von 30 min lag etwa die Hälfte von ArcA-His₆ im phosphorylierten Zustand vor. Dieses Verhältnis blieb bei den folgenden Proben nach 60 min und 120 min Inkubation konstant. Phos-tag ist demnach geeignet, phosphoryliertes ArcA nachzuweisen und kann möglicherweise auch für die Identifikation von NreC-P im SDS-Gel eingesetzt werden.

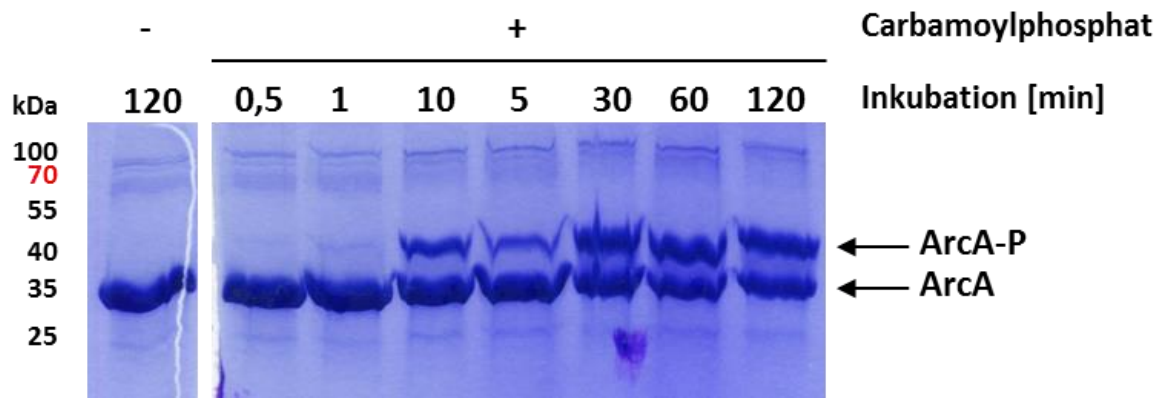


Abb 26: **Phosphorylierung von ArcA durch Carbamoylphosphat.** 10 μ g ArcA-His₆ wurde mit 50 mM Carbamoylphosphat bei 25 °C inkubiert und einer SDS-PAGE mit 75 μ M Phos-tag™ und 150 μ M MnCl₂ unterworfen.

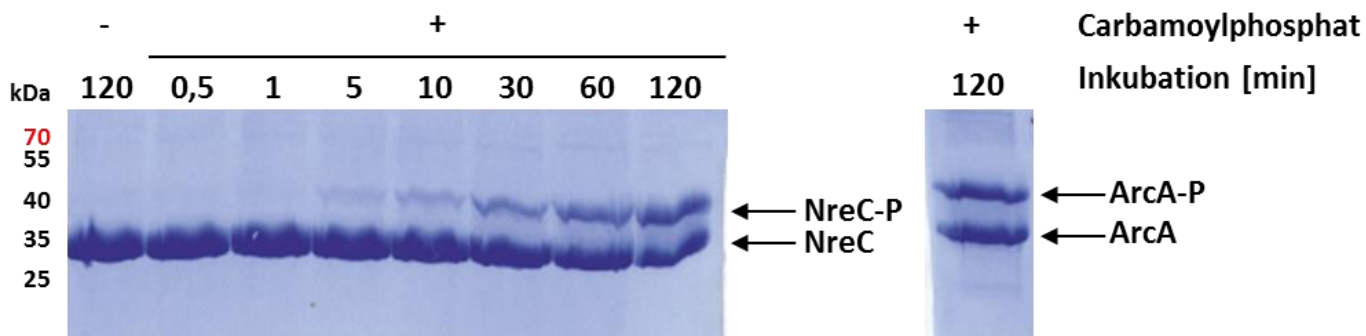


Abb. 27: **Phosphorylierung von NreC durch Carbamoylphosphat.** 10 μ g NreC-Strep (27 kDa) wurde mit 50 mM Carbamoylphosphat bei 25 °C inkubiert und einer SDS-PAGE mit 75 μ M Phos-tag™ und 150 μ M MnCl₂ unterworfen (links). Zusätzlich wurde ArcA-His₆ für 120 min mit 50 mM Carbamoylphosphat phosphoryliert (rechts).

Analog zu ArcA-His₆ wurde NreC-Strep phosphoryliert und nachgewiesen (Abb. 27). Ohne Carbamoylphosphat wurde kein phosphoryliertes NreC-Strep detektiert. NreC-Strep zeigte eine Bande von $M_r \sim 35$ kDa. Nach 5-10 min Inkubation mit Carbamoylphosphat war eine schwache Bande an phosphoryliertem NreC (NreC-P) nachzuweisen, deren Intensität kontinuierlich zunahm. Nach 120 min lag etwa 50 % des Proteins im phosphorylierten Zustand vor.

Der Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Phosphorylierung des Antwortregulators wurde ebenfalls untersucht (Abb. 28 links). Dazu wurde das Protein nach der Isolierung entweder bei 4 °C gelagert oder sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Phosphorylierung bei -80 °C gelagert. Nach 7 Tagen wurden die Proteine für die Phosphorylierung verwendet. Unabhängig von der Lagerung wurden beide unterschiedlich

gelagerten Proteine zu gleichen Maßen phosphoryliert. Nach 120 min war sowohl bei der Lagerung bei 4 °C wie auch bei -80 °C etwa die Hälfte des Proteins phosphoryliert.

Neben der Temperatur- und Lagerungsabhängigkeit der Phosphorylierung ist auch die Spezifität der Phosphorylierung entscheidend. Neben dem konservierten Aspartatrest D53 von NreC, der durch NreB phosphoryliert wird, besitzt NreC noch 16 weitere Aspartatreste, die als potentielle Phosphoakzeptoren für Carbamoylphosphat fungieren können. Die Variante NreC(D53A)-Strep wurde erstellt und auf die Spezifität der Phosphorylierung untersucht (Abb. 28 rechts). Die Variante wurde durch Carbamoylphosphat unabhängig von der Lagerdauer und Temperatur nicht phosphoryliert. Die Phosphorylierung durch Carbamoylphosphat scheint spezifisch für den konservierten Aspartatrest D53 zu sein.

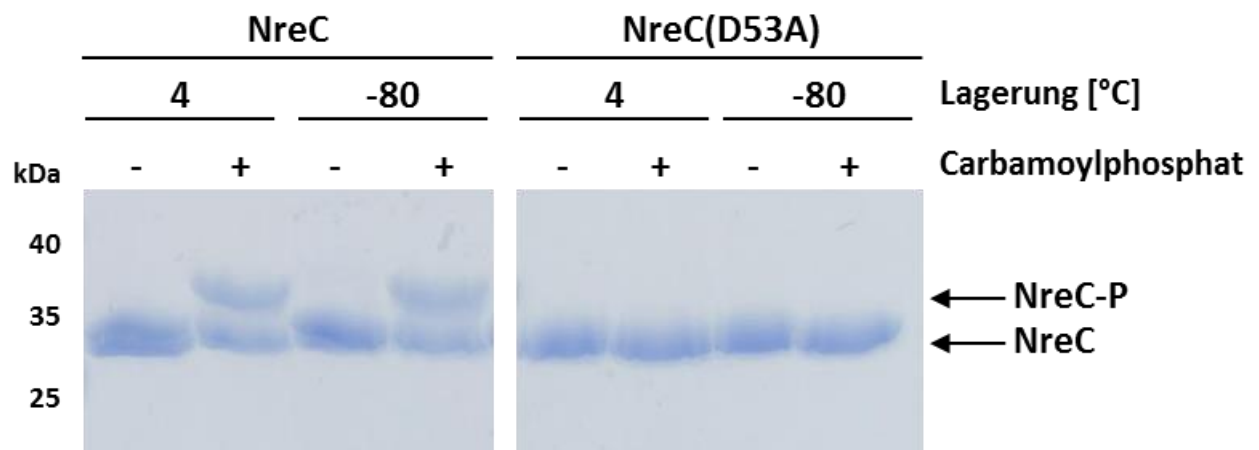


Abb 28: **Phosphorylierung von NreC und NreC(D53A).** 15 µg NreC-Strep (links) bzw. NreC(D53A)-Strep (rechts) wurden ohne (-) oder mit 50 mM Carbamoylphosphat (+) für 2 h bei 25 °C inkubiert. Die Proteine lagerten vorher für 7 Tage bei den angegebenen Temperaturen. Jeweils 5 µg Protein wurden einer SDS-PAGE mit 75 µM Phos-tag und 150 MnCl₂ unterworfen.

5. Diskussion

Bakterien detektieren Änderungen in dem sie umgebenden Milieu zumeist durch ZKS. Diese bestehen aus einem Sensorprotein, das den jeweiligen Reiz perzipiert und einem Regulatorprotein, das die spezifische Antwort auslöst. Die Reizweiterleitung erfolgt durch einen Phosphoryltransfer von einem konservierten Histidinrest des Sensors auf einen konservierten Aspartatrest des Antwortregulators. Für die Autophosphorylierung des Sensors dient ATP als Phosphodonor. Unabhängig von ihrem zugehörigen Sensor können Antwortregulatoren auch durch verschiedene niedermolekulare Phosphodonoren phosphoryliert werden (Lukat *et al.*, 1992). So wird in der Chemotaxis von *E. coli* CheY beispielweise durch Acetylphosphat phosphoryliert, ADP hat dagegen keine Wirkung (Lukat *et al.*, 1992). Der letzte Phosphorylierungsschritt der ZKS stellt die Rückführung des Antwortregulators in seine unphosphorylierte Form dar. Diese Dephosphorylierung gewährleistet die alleinige Aktivität des (phosphorylierten) Antwortregulators unter spezifischen Bedingungen und wirkt der unspezifischen Aktivierung des Antwortregulators durch Cross-talk (Phosphorylierung durch nicht-zugehörige Sensorkinase) und/oder durch niedermolekulare Phosphodonoren entgegen. Die Dephosphorylierung von Antwortregulatoren kann entweder durch eine intrinsische Autophosphataseaktivität, durch den zugehörigen Sensor oder durch ein Hilfsprotein katalysiert werden. Ein Zusammenwirken von zwei oder mehreren Dephosphorylierungsmechanismen ist ebenso möglich (Huynh und Stewart 2011).

In 2010 haben Huynh *et al.* in der Sensorhistidinkinase NarX von *E. coli* das Phosphatasemotiv DxxxQ identifiziert. Dessen konservierte Aminosäurereste sind wichtig für die Kinase- und Phosphataseaktivität von NarX, um eine spezifische Zellantwort auf den Stimulus Nitrat zu gewährleisten. Auch in der Sensorhistidinkinase NreB wurde das DxxxQ-Motiv nachfolgend auf den konservierten Histidinrest H159 gefunden. Die Funktion dieses möglichen Phosphatasemotivs für das NreBC-ZKS und die Regulierung der Genexpression der anaeroben Nitratatmung wurde durch Varianten des konservierten Aspartat- und Glutaminrests *in vivo* und *in vitro* untersucht.

5.1 Die konservierten Aminosäurereste des Phosphatasemotivs haben unterschiedliche Funktionen

Die Kinasedomäne von Sensorhistidinkinasen gliedert sich auf Grundlage der Aminosäuresequenz der DHP-Domäne in fünf Unterfamilien: HisKA, HisKA_2, HisKA_3, His-Kinase und HWE (Grebe und Stock 1999; Willett und Kirby 2012).

In der Sensorhistidinkinase NarX wurde das DxxxQ-Phosphatasemotiv identifiziert (Huynh *et al.*, 2010). NarX reguliert zusammen mit dem Antwortregulator NarL die anaerobe Nitratatmung (Stewart 1993). Laut Proteindatenbanken gehört NarX ebenso wie NreB zu der Unterfamilie der HisKA_3 Sensorhistidinkinasen. Es wurde gezeigt, dass der konservierte Aspartatrest, der unmittelbar auf den zu phosphorylierenden Histidinrest folgt, für die Kinase- und die Phosphataseaktivität wichtig ist, während der konservierte Glutaminrest nur für die Phosphataseaktivität wichtig ist. Das DxxxQ-Motiv findet sich auch in anderen Sensorhistidinkinasen der Unterfamilie HisKA_3 (Tab. 7), wobei in 30 % der von Huynh *et al.*, 2010 untersuchten Proteinen der Glutaminrest durch einen Histidinrest ersetzt ist. Welche Bedeutung diese Substitution hat ist noch unklar. Variationen des konservierten Glutamins in den bifunktionalen Sensoren HrrS und ChrS (beide HisKA_3) aus *C. glutamicum* waren nicht länger in der Lage, die Antwortregulatoren HrrA und ChrA zu dephosphorylieren, was zu einer erhöhten Aktivität ihrer Zielpromotoren führte. Die Funktion des konservierten Aspartats wurde nicht untersucht (Hentschel *et al.*, 2014).

In Sensorhistidinkinasen der Unterfamilie HisKA findet sich ein analoges Motiv. Es handelt sich dabei jedoch um ein E/DxxT/N-Motiv (Huynh *et al.*, 2010). CrdS aus *Myxococcus xanthus* zeichnet sich durch ein ExxN-Motiv aus (HisKA). Die Funktion des konservierten Glutamats beschränkt sich auf die Kinaseaktivität, die des konservierten Asparagins auf die Phosphataseaktivität. Gleiches gilt ebenfalls für weitere CrdS-Homologe aus *M. xanthus* (Willett und Kirby, 2012). Die Sensorhistidinkinase SaeS (HisKA) aus *Staphylococcus aureus* besitzt ebenfalls ein DxxT-Motiv, zeigt alleine jedoch keine Phosphataseaktivität gegenüber ihrem Antwortregulator SaeR. Erst durch die Komplexbildung mit den zwei Hilfsproteinen SaeP und SaeQ wird die Phosphataseaktivität von SaeS aktiviert. Der konservierte Aspartatrest ist dabei sowohl für die Kinase- wie für die Phosphataseaktivität essentiell, während die Mutation des konservierten Threonins keine Auswirkung auf die Funktion von SaeS hat (Jeong *et al.*, 2012).

Tab. 7: Auswahl von Proteinen mit einem DxxxQ oder E/DxxT/N-Phosphatasemotiv

Bakterium	Protein	Funktion	Subfamilie	Motiv	Quelle
<i>E. coli</i>	CheX	Chemotaxis (Hilfsprotein)	-	ExxN	Silversmith 2010
<i>E. coli</i>	CheZ	Chemotaxis (Hilfsprotein)	-	DxxxQ	Zhao <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i>	NarX	Nitratsensor des NarXL-Zweikomponentensystems	HisKA_3	DxxxQ	Huynh <i>et al.</i> , 2010
<i>C. glutamicum</i>	HrrS	Häm-Homöostase, Verwendung von Häm als alternative Fe-Quelle	HisKA_3	DxxxQ	Hentschel <i>et al.</i> , 2014
<i>C. glutamicum</i>	ChrS	Häm-Homöostase, Repressor der Häm-Biosynthese	HisKA_3	DxxxQ	Hentschel <i>et al.</i> , 2014
<i>S. carnosus</i>	NreB	Sauerstoffsensor des NreBC-Zweikomponentensystems	HisKA_3	DxxxQ	diese Arbeit
<i>M. xanthus</i>	CrdS	Aggregation und Fruchtkörperbildung	HisKA	ExxN	Willett und Kirby 2012
<i>S. aureus</i>	SaeS	Virulenz	HisKA	DxxT	Jeong <i>et al.</i> , 2012
<i>E. coli</i>	DcuS	anaerobe Fumaratatmung	HisKA	ExxN	-

5.2 Rolle des DxxxQ-Motivs im Sauerstoffsensor NreB von *S. carnosus*

In *S. carnosus* wird die anaerobe Nitratatmung durch die Proteine NreA, NreB und NreC reguliert (Fedtke *et al.*, 2002). NreB und NreC wirken dabei als ein ZKS. NreB detektiert Sauerstoff direkt mittels eines $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -Clusters in der sensorischen PAS-Domäne und wird am konservierten Histidinrest H159 autophosphoryliert. Der Phosphorylrest wird auf den konservierten Aspartatrest D53 des Antwortregulators NreC übertragen. NreC-P fungiert als Transkriptionsfaktor und reguliert positiv die Expression der Gene der Nitratatmung. Das dritte Protein für die Regulation der Nitratatmung ist der Nitratsensor NreA (Fedtke *et al.* 2002, Nilkens *et al.*, 2014, Niemann *et al.*, 2014). In *S. carnosus* wurden keine weiteren homologen Proteine zu bereits bekannten Nitratsensoren entdeckt, sodass NreA vermutlich den alleinigen Nitratsensor darstellt. NreA interagiert mit NreB, aber nicht mit NreC (Koch-Singenstreu 2013; Nilkens *et al.*, 2014; Klein 2018) und moduliert die Autophosphorylierungsaktivität der Sensorkinase NreB Nitrat-abhängig. Dies führt zu einer

maximalen Expression der Gene der Nitratatmung unter Anaerobiose in Anwesenheit von Nitrat (Nilkens *et al.*, 2014, Niemann *et al.*, 2014).

Während die Autophosphorylierung von NreB und der Phosphoryltransfer auf NreC gut untersucht sind (Fedtke *et al.*, 2002, Nilkens *et al.* 2014) gibt es bisher wenig Informationen zur Regulation der Dephosphorylierung von NreC. Dieser Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Im Alignment mit anderen Sensorhistidinkinasen der Unterfamilie HisKA_3 wurde auch in der Kinasedomäne von NreB das DxxxQ-Motiv identifiziert. Das Motiv liegt im N-terminalen Bereich der DHP-Domäne (Aminosäure 150-215) der Kinasedomäne (Aminosäure 153-347) bei Position D160 bzw. Q164 unmittelbar hinter dem konservierten Histidinrest H159. Getrennt werden die konservierten Reste durch die weniger stark konservierten Reste G161, I162 und V163. Mit der sauren Carboxylgruppe bzw. der Amidgruppe der Seitenketten der konservierten Aminosäurereste erfüllt das Motiv die proteinbiochemischen Voraussetzungen für die Funktionsweise wie das DxxxQ-Motiv von NarX. Um die Bedeutung des DxxxQ-Motivs von NreB zu untersuchen, wurden Varianten des konservierten Aspartatrests und des konservierten Glutaminrests erstellt und diese *in vivo* und *in vitro* untersucht.

5.3 Die Bedeutung von NreB(D160)

Varianten von NarX(D400) zeigten in *E. coli* keine *in vitro* Phosphorylierung, was zu einem *in vivo* OFF-Phänotyp bei der Regulation der Nitratreduktase führt. Abhängig von der Substitution des konservierten Aspartatrests blieb die Phosphatasefunktion erhalten (NarX(D400N) und NarX(D400E)) bzw. ging verloren (NarX(D400A) und NarX(D400S)) (Huynh *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse führten zur Annahme, dass NarX(D400) sowohl für die Kinase- wie auch für die Phosphataseaktivität entscheidend ist. Varianten von NreB(D160) zeigten *in vivo* einen wildtypischen Phänotyp in der *narG-lip* Aktivität, wurden durch Nitrat anaerob im Wachstum stimuliert und bildeten Nitrit. Überraschenderweise wurde die Variante NreB(D160A) *in vitro* nicht phosphoryliert. Dies widerspricht dem *in vivo* Phänotyp. Anscheinend ist der Aminosäurerest NreB(D160) wichtig für die Autophosphorylierung von NreB, ist aber für die Regulation der Genexpression der anaeroben Atmung nicht essentiell. Ob die Substitution von Aspartat zu Alanin eine Instabilität von NreB bewirkt, durch die das Protein *in vitro* seine Funktionsfähigkeit verliert, wurde nicht untersucht. Die

Phosphorylierung von NreB ist der erste Schritt zur Induktion der Expression der Gene des Nitratstoffwechsels. Denkbar wäre, dass ein weiterer Faktor zusätzlich zu NreABC diese Expression reguliert. Da es bei Abwesenheit von NreABC jedoch nicht zur Transkription der Zielgene kommt, ist NreABC für dessen Aktivität essentiell. Das ZKS AirSR (früher YhcSR) reguliert in *S. aureus* neben der Expression von NreABC die Genexpression der anaeroben Nitratatmung (Sun *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012). Die Sensorhistidinkinase AirS detektiert O₂, H₂O₂ oder NO und phosphoryliert den Antwortregulator AirR. Dieser aktiviert die Genexpression der Nitratreduktase und der *nreABC*-Gene. Ebenso wie NreABC reagiert AirSR auf Anaerobiose; die Aktivität wird durch Nitrat maximiert (Yan *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012). Dadurch ließe sich der wildtypische Phänotyp der Varianten NreAB(D160A)C bzw. NreAB(D160S)C erklären. Zu beachten ist jedoch, dass in den Promotoren der Nitratreduktase und des Nitrattransporters keine weiteren Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit Ausnahme von NreC gefunden wurden (Fedtke *et al.*, 2002). Möglicherweise konkurrieren die phosphorylierten Antwortregulatoren NreC und AirR um die Bindung an die Promotoren oder AirSR interagiert mit (phosphoryliertem) NreC, welcher als einziger Transkriptionsfaktor an die Promotoren der Gene der anaeroben Nitratatmung bindet. Für die letztere Hypothese spricht, dass es bei Abwesenheit von NreABC zu keiner *narG-lip* Aktivität kommt (Nilkens *et al.*, 2014). Für einen weiteren regulatorischen Faktor der anaeroben Nitratatmung in *S. carnosus* spricht ebenfalls, dass die Lokalisation der Bindestellen für NreC im Promotor der Nitritreduktase von denen in den Promotoren der Nitratreduktase und des Nitrattransporters abweichen: Statt im Promotor-Bereich von -35 und -60 bis -70 liegen die NreC-Bindestellen im Bereich von -90 und -60 und -70. Die palindromische Sequenz im *nir*-Promotor im Bereich von -35 unterscheidet sich von der in den *narG*- und *narT*-Promotoren und stellt eine potentielle Bindestelle für ein noch unbekanntes Protein dar (Fedtke *et al.*, 2002).

5.4 Die Bedeutung von NreB(Q164)

Die Varianten NreAB(Q164A)C und NreAB(Q164E) wurden *in vivo* getestet. Da in 30 % der untersuchten Proteine der Subfamilie HisKA_3 der konservierte Glutaminrest durch einen Histidinrest substituiert ist (Huynh *et al.*, 2010), wurde auch die Variante NreAB(Q164H)C untersucht. *In vivo* zeigt NreAB(Q164E)C einen wildtypischen Phänotyp. Die Substitution der

Aminogruppe durch eine Hydroxylgruppe in der Seitenkette der Aminosäure scheint folglich keinen Einfluss auf die Funktion von NreB zu haben. Beide Aminosäure-Seitenketten wären in der Lage, gemäß dem von Huynh *et al.*, 2010 vorgeschlagenen Mechanismus das nukleophile H₂O-Molekül für die Phosphohydrolyse zu koordinieren. Diese Austauschbarkeit von Amid und Carboxylgruppe und dem dabei beobachteten Funktionserhalt von NreB(Q164E) ist ein Indiz für die Rolle von NreB(Q164) in der Phosphatasereaktion. Die Substitution von Glutamin zu Alanin bzw. Histidin führt dagegen zu einem ON-Phänotyp im *narG-lip* Reporterassay. Dies weist auf eine Funktionsstörung des NreABC-Systems hin. Bisher wurden nur NreA-Varianten charakterisiert, die durch eine gestörte Protein-Protein-Interaktion (Homodimerisierung von NreA und Heterodimerisierung von NreA mit NreB) zu einem ON-Phänotyp führen (Niemann *et al.*, 2014). Auch die Deletion von NreA führt zu einem ON-Phänotyp (Nilkens *et al.*, 2014). Dieser ist charakterisiert durch einen Nitrat-unabhängige Stimulierung der *narG-lip* Aktivität („Nitrat-blind“) bei aeroben und anaerobem Wachstum (Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). Die aerobe Aktivität dieser ON-Phänotypen weist auf eine funktionierende Aktivierung des Antwortregulators NreC auch bei Anwesenheit von Sauerstoff hin (Sauerstoff- und Nitrat-unabhängig) bzw. auf die Beteiligung eines weiteren Faktors zur (aeroben) Regulierung der Nitratreduktase. Wodurch die aerobe Aktivität hervorgerufen wird, ist unklar. Das *nreABC*-Operon wird vermutlich konstitutiv exprimiert (Schlag *et al.*, 2008), die Genexpression von *nreABC* findet auch unter aeroben Bedingungen in *S. carnosus* statt (Fedtke *et al.*, 2002; Handel 2013). Die Kinaseaktivität des Sauerstoffsensors NreB wird über ein sauerstofflabiles [4Fe4S]²⁺-Cluster in der sensorischen PAS-Domäne reguliert, Exposition mit Sauerstoff führt zu dessen Degradation (Müllner *et al.*, 2008). Die Degradation des [4Fe4S]²⁺-Cluster korreliert mit der Abnahme der NreB-Autophosphorylierung (Müllner *et al.*, 2008). Die Regulation der Phosphorylierungsaktivität von NreB durch NreA erfolgt dagegen unabhängig vom FeS-Cluster (Nilkens 2013). Da auch aerobes NreB *in vitro* eine signifikante Autophosphorylierung aufweist (Nilkens 2013) führt dies möglicherweise zusammen mit der reduzierten Dephosphorylierung des Antwortregulators NreC zu der aeroben Aktivität. Denkbar ist auch eine aerobe NreB-unabhängige Aktivierung des Antwortregulators. Da NreC alleine jedoch keine Lipaseaktivität bewirkt, kann dies ausgeschlossen werden. Ob die Mutation von NreB(Q164) einen Einfluss auf die aerobe Autophosphorylierung hat wurde *in vitro* nicht untersucht.

In vitro zeigen die Varianten NreB(Q164A) und NreB(Q164H) eine geringere Autophosphorylierung, einen unvollständigen Phosphotransfer auf NreC und eine verlangsamte Dephosphorylierung von NreC-P. Diese Daten zeigen, dass NreB(Q164) für die Phosphorylierungsreaktionen im NreBC-Zweikomponentensystem wichtig ist. NreB(Q164) spielt für die Kinase- und Phosphataseaktivität eine besondere Rolle, jedoch eine geringere für die Phosphorylierung von NreC. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Antwortregulatoren auch ihre eigene Phosphorylierung katalysieren können. Als Phosphodonore sind sowohl phosphorylierte Sensorhistidinkinase und kleinere Moleküle wie ATP oder Carbamoylphosphat möglich (Lukat *et al.*, 1992). Da nach dem Phosphotransfer ein geringer Anteil an phosphoryliertem NreB(Q164A) bzw. NreB(Q164H) zurückbleibt, scheint die Aminosäuresubstitutionen die phosphorylierte Form von NreB bei Interaktion mit NreC zu stabilisieren. Durch die verlangsamte Dephosphorylierung lässt sich der ON-Phänotyp im *narG-lip* Reporterassay erklären: NreC wird mittels NreB(Q164A)-P bzw. NreB(Q164H)-P phosphoryliert, was zu einer *narG-lip* Aktivität führt. Da NreC-P durch die Varianten nicht im gleichen Maße wie durch wildtypisches NreB dephosphoryliert wird, liegt in der Summe mehr phosphorylierter Antwortregulator vor.

Bei der Dephosphorylierung müssen vier verschiedene Bedingungen berücksichtigt werden, die für *S. carnosus* relevant sind: Aerobe Wachstumsbedingungen mit oder ohne Nitrat und anaerobe Wachstumsbedingungen mit oder ohne Nitrat. Unter allen vier Bedingungen wird *nreABC* transkribiert (Fedtke *et al.*, 2002). Auch *narGHJI*-Transkripte liegen schon unter aeroben Bedingungen vor, da das Nitratreduktase-Operon mit *nreABC* kotranskribiert wird (Fedtke *et al.*, 2002). Obwohl es *in vivo* bei wildtypischem NreABC zu keiner aeroben Aktivität kommt, konnte bei *in vitro* Phosphorylierungen mit NreB nach Luftinkubation eine Autophosphorylierung gemessen werden (Müllner *et al.*, 2008). Die fehlende *narG-lip* Aktivität lässt sich dadurch erklären, dass unter aeroben Bedingungen die Dephosphorylierung von NreC-P gegenüber der NreB- bzw. NreC-Phosphorylierung überwiegt um eine unspezifische Zellantwort zu vermeiden. Welchen Einfluss Sauerstoff auf die Dephosphorylierung hat ist unklar. Denkbar wäre eine Stimulierung der Phosphataseaktivität von NreB unter aeroben Bedingungen und eine Hemmung der Phosphataseaktivität unter anaeroben Bedingungen. Die Abwesenheit des Stimulus führt auch in anderen ZKS zu einer erhöhten Phosphataseaktivität der Sensorhistidinkinase (Huynh *et al.*, 2010).

5.5 NreA hat keinen Einfluss auf die Dephosphorylierung von NreC-P

Die Genregulation der anaeroben Nitratatmung von *S. carnosus* erfolgt durch den Sauerstoffsensor NreB, den Antwortregulator NreC und den Nitratsensor NreA (Fedtke *et al.*, 2002; Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). NreA moduliert Nitrat-abhängig die Phosphorylierung von NreB, sodass es zu einer maximalen Genexpression der Nitratreduktase unter Anaerobiose mit Verfügbarkeit von Nitrat kommt. Die Modulierung der NreB-Phosphorylierung wird durch eine veränderte NreA-NreB-Interaktion verursacht (Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). Die Protein-Protein-Interaktion wurde mittels BACTH und HPINE/SPINE in *E. coli* in Abwesenheit von NreC gezeigt (Niemann *et al.*, 2014). Neuere Experimente zeigen einen stabilisierenden Effekt von NreC auf die Interaktion von NreA und NreB (Klein 2018). Ein Testsystem für die Proteininteraktion in *S. carnosus* gibt es bisher nicht. Denkbar ist, dass neben der Kinaseaktivität auch die Phosphataseaktivität von NreB durch NreA beeinflusst wird. Speziell die Abwesenheit des Stimulus Nitrat könnte zu einer verstärkten Dephosphorylierung von NreC führen. *In vitro* wurde die Dephosphorylierung von NreC-P mit wildtypischem NreB bzw. NreB(Q164H) mit NreA und NreA mit Nitrat getestet. Mit wildtypischem NreB hat NreA unabhängig von der An- und Abwesenheit von Nitrat keinen Einfluss auf die Dephosphorylierung von NreC-P. Die Rolle von NreA in der Regulation der anaeroben Nitratatmung scheint sich also lediglich auf die Aktivierung von NreC mittels Nitrat-abhängiger Modulierung der NreB-Phosphorylierungsaktivität zu beschränken. Die Inaktivierung von NreC-P durch Dephosphorylierung scheint NreA-unabhängig zu erfolgen. Ob und in welchem Ausmaß NreA mit NreB in dessen „Phosphatase-kompetenten“ Konformation interagiert, ist unklar. Der Aminosäurerest NreB(Q164) scheint dabei keine Rolle zu spielen. Durch die Substitution durch Histidin scheint NreB jedoch in eine NreA-responsive Form überführt zu werden. Zusammen mit NreB(Q164H) zeigt NreA einen deutlichen Effekt auf die Dephosphorylierung von NreC-P. Diese wird durch NreA verlangsamt, was durch Nitrat nochmals verstärkt wird. Ebenso wie bei der Autophosphorylierung moduliert NreA in der Variante auch die Dephosphorylierung Nitrat-abhängig. Der zuvor beobachteten schwächeren Autophosphorylierung der NreB(Q164H)-Variante wirkt die gehemmte Dephosphorylierung entgegen. Dies führt zu dem ON-Phänotyp im *narG-lip* Reportersystem.

5.6 Die intrinsische Autophosphataseaktivität von NreC

In vitro nahm die Phosphorylierung von NreC bereits ohne den Sauerstoffsensor NreB ab. Dies ist ein Indiz für eine intrinsische Phosphataseaktivität des Antwortregulators. NreB unterstützt jedoch die NreC-Dephosphorylierung. Die intrinsische Autophosphataseaktivität ist für viele Antwortregulatoren bekannt (Stock *et al.*, 1989). Die Rate variiert stark, abhängig von dem jeweils zu regulierenden Stoffwechsel (Bourret 2010). In der Regulation der Chemotaxis von *Rhodobacter sphaeroides*, in der die Bakterien sekundenschnell auf veränderte Stimuli reagieren müssen, wurde für den Antwortregulator CheY6 eine Autodephosphorylierungsrate von $0,28 \text{ s}^{-1}$ beobachtet (Porter und Armitage, 2002). Bei länger andauernden Stoffwechselreaktionen wie der Zellaggregation zeigen die Antwortregulatoren eine niedrigere Rate, wie die des Antwortregulators RedF von *M. xanthus* mit $0,25 \text{ Woche}^{-1}$ (Jagadeesan *et al.*, 2009). Die intrinsische Phosphataseaktivität wird oftmals auch durch die Sensorkinase verstärkt (West und Stock, 2001; Gao und Stock, 2009).

Eine Herausforderung bei den *in vitro* Studien zur Phosphataseaktivität der NreB(DxxxQ)-Varianten war es, NreB-His₆ komplett durch Zentrifugation schnell aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. In dem gewonnen NreC-Strep haltigen Eluat war jedoch noch NreB enthalten, sodass die beobachtete Autodephosphorylierung auch auf restliches NreB zurückgeführt werden kann. Eine Optimierung der Methode ist nötig.

5.7 *In vivo* Aktivität von NreC hängt von NreAB ab

NreC ist der Transkriptionsfaktor im NreBC-ZKS, der nach Aktivierung durch Phosphorylierung an einem konservierten Aspartatrest D53 an GC-reiche, palindromische Sequenzen in den Promotoren der Nitratreduktase, der Nitritreduktase und des Nitrattransporters bindet und deren Expression induziert. Die Bindemotive in den Promotoren der Nitratreduktase und des Nitrattransporters liegen im Bereich von -35 und -60 bis -70. Der Promotor der Nitritreduktase variiert hinsichtlich der Lokalisation der Bindemotive im Bereich von -90. Eine zusätzliche palindromische Bindesequenz bei -35 lässt auf einen weiteren Regulationsmechanismus schließen (Fedtke *et al.*, 2002). Als typischer Antwortregulator eines Zweikomponentensystems wird NreC durch seine zugehörige Sensorhistidinkinase NreB phosphoryliert (Fedtke *et al.*, 2002; Nilkens *et al.*, 2014). Von

anderen Antwortregulatoren ist bekannt, dass diese auch Sensor-unabhängig durch niedermolekulare Phosphodonoren phosphoryliert werden können (Lukat *et al.*, 1992). NreC konnte *in vitro* langsam mittels Carbamoylphosphat phosphoryliert werden. Die *in vitro* Phosphorylierung ist spezifisch für den konservierten Aspartatrest D53. Trotz der erfolgreichen *in vitro* Phosphorylierung war der Stamm *S. carnosus* m1, der lediglich plasmidkodiertes NreC exprimierte, *in vivo* nicht in der Lage die Expression der Nitratreduktase positiv zu regulieren. Dieser Stamm zeigte keine *narG-lip* Aktivität. *In vivo* scheint die Phosphorylierung von NreC durch Carbamoylphosphat (oder andere niedermolekulare Phosphodonoren) keine signifikante Rolle für dessen Aktivität zu spielen. Die Aktivität von NreC hängt von NreB bzw. von NreB und NreA ab.

5.8 Weitere wichtige Aminosäuren für die NreC-Phosphorylierung

Neben dem konservierten Aspartatrest als Phosphorylierungsstelle spielen noch weitere Aminosäuren für die Phosphorylierung von Antwortregulatoren eine entscheidende Rolle. Der Antwortregulator CheY, der die Chemotaxis in *E. coli* reguliert, wird an D57 phosphoryliert (Sanders *et al.*, 1989). Dieser Aminosäurerest befindet sich in räumlicher Nähe zu CheY(D12), CheY(D13), CheY(T87) und CheY(K109), die zusammen mit CheY(D57) ein Cluster bilden (Stock *et al.*, 2000). Die drei Aspartatreste bilden eine saure Tasche, über die zusammen mit CheY(N59) das für die Phosphorylierungsreaktion wichtige divalente Metallion Mg^{2+} gebunden wird (Lukat *et al.*, 1990; Lukat *et al.*, 1991; Needham *et al.*, 1993). CheY(K109) ist indirekt an Autophosphatasereaktion von CheY beteiligt; CheY(K109) und CheY(T87) sind wichtig für die durch die Phosphorylierung ausgelöste Konformationsänderung (Lukat *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1997; Appleby und Bourret 1998). Für CheY(K109) wurde eine essentielle Rolle in der Interaktion mit CheY(D57), CheZ oder den Motorproteinen vorgeschlagen (Lukat *et al.*, 1991). Im Vergleich mit NreC entsprachen diese Aminosäuren NreC(D7), NreC(D8), NreC(T82) und NreC(K104). Ob diese Aminosäuren ebenfalls eine Rolle in der Regulierung der Phosphorylierung von NreC spielen wurde nicht untersucht, ist aber im Rahmen der Aufklärung des Dephosphorylierungsmechanismus von NreC-P interessant.

5.9 Bedeutung des Stimulus für die Phosphataseaktivität

Die *in vitro* Versuche wurden stets mit anaerob isoliertem NreB und unter Sauerstoffausschluss durchgeführt. Die Dephosphorylierung von NreC-P ist besonders dann von Nöten, wenn die Zelle bei Verfügbarkeit von Sauerstoff bzw. einem Umstellen der Stoffwechselleistung von anaerobem auf aeroben Bedingungen gewährleisten muss. Unter diesen Bedingungen liegt NreB in der FeS-freien Form vor. Die oben genannten Experimente wurden jedoch mit FeS-haltigem NreB durchgeführt. Ein Vergleich der Aktivität der Varianten in aerobem (FeS-freiem) und anaeroben (FeS-haltigem) NreB kann eine eindeutigere Erkenntnis zur Bedeutung des DxxxQ-Motivs beisteuern.

5.10 Arbeitsmodell zur Regulation der NreC-Aktivität

Das Arbeitsmodell setzt sich aus dem aus früheren Arbeiten gewonnenen Erkenntnissen zur Phosphorylierung von NreC und den aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnissen zur NreC-Dephosphorylierung zusammen (Abb. 29). Die Aktivierung von NreC setzt die phosphorylierte Sensorkinase NreB voraus, deren Phosphorylierung durch den Nitratsensor NreA moduliert wird. Die Phosphorylgruppe wird von dem konservierten Rest H159 auf D53 von NreC übertragen. Der Einfluss eines weiteren Histidinrests in NreB oder eines noch unbekannten Faktors auf die NreC-Phosphorylierung ist möglich. Die Inaktivierung von NreC durch Dephosphorylierung wird durch eine intrinsische Autophosphatase katalysiert, die durch NreB unterstützt wird. Die Regulation der NreB-Phosphataseaktivität erfolgt durch das konservierte DxxxQ-Phosphatasemotiv in der sensorischen PAS-Domäne. Besonders der konservierte Glutaminrest NreB(Q164) ist für die Phosphataseaktivität entscheidend. Gemäß der von Huynh *et al.*, 2010 postulierten Hypothese koordiniert der Glutaminrest das nukleophile H₂O-Molekül für die Acylphosphathydrolyse (Abb. 30). In NarX ist ebenfalls der konservierte Aspartatrest NarX(D400) an der Hydrolyse durch Bildung einer Wasserstoffbrücke mit NarL(K109) beteiligt. Eine vergleichbare Funktion von NreB(D160) konnte nicht bestätigt werden. Daher scheint die Phosphataseaktivität von NreB durch einen ähnlichen, aber nicht identischen Mechanismus wie in NarX reguliert zu werden.

Der Nitratsensor NreA ist nicht an der Dephosphorylierung beteiligt. Inwiefern FeS-freies apoNreB, welches bei aeroben Bedingungen vorliegt, an der NreC-Dephosphorylierung beteiligt ist, ist unbekannt aber ein Einfluss ist denkbar.

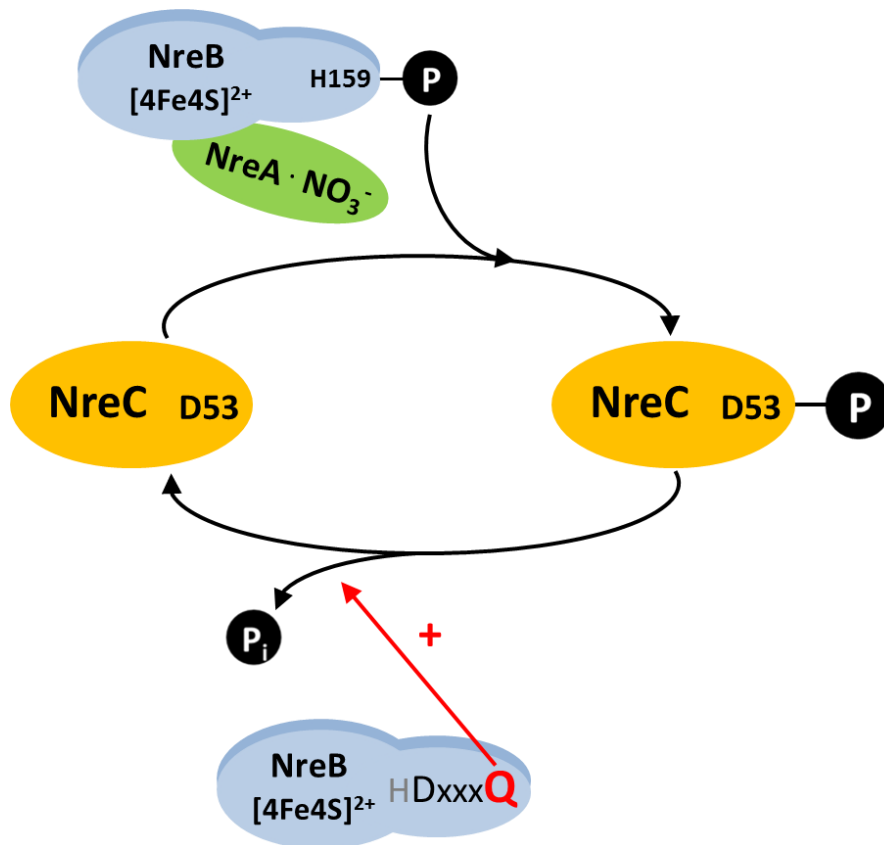


Abb. 29: **Arbeitsmodell zur NreC-Dephosphorylierung.** An der Phosphorylierung von NreC ist der NreAB-Sensorkomplex beteiligt, während die Dephosphorylierung durch eine durch NreB unterstützte intrinsische Autodephosphatasereaktion katalysiert wird.

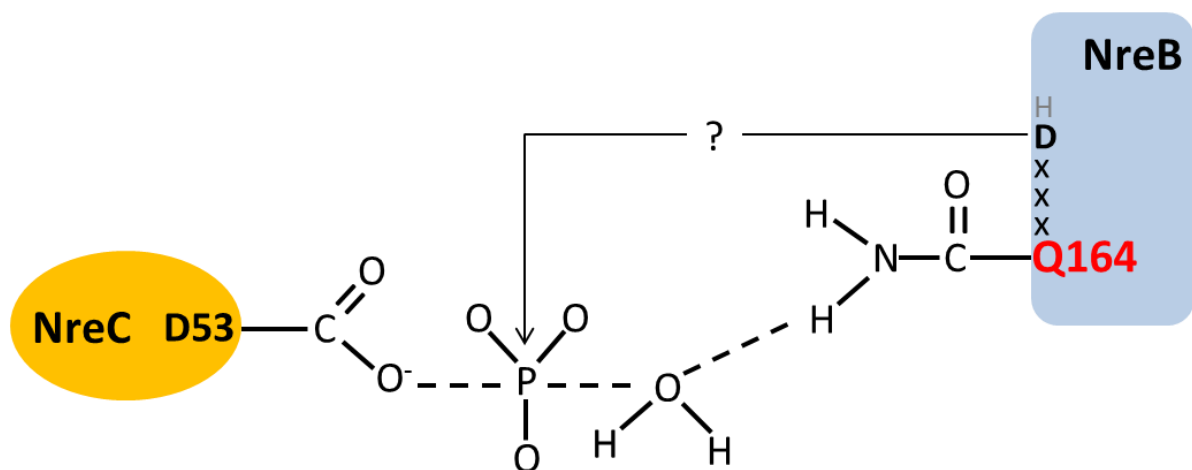


Abb. 30: **Mechanismus der Phosphatase-Aktivität.** Der konservierte Glutaminrest NreB(Q164) koordiniert das nukleophile H₂O-Molekül, welches an der Acylphosphathydrolyse beteiligt ist. Die Funktion des konservierten Aspartatrests NreB(D160) ist unklar.

5.11 NreB(H159): Nicht die alleinige Phosphorylierungsstelle?

Sensorhistidinkinasen zeichnen sich dadurch aus, dass sie an einem konservierten Histidinrest der DHP-Domäne in der Kinasedomäne autophosphoryliert werden. Durch Sequenzvergleiche wurde der konservierte Histidinrest H159 als mögliche Phosphorylierungsstelle in NreB identifiziert (Fedtke *et al.*, 2002). Experimentelle Beweise fehlen bisher. Die Variante NreB(H159Q) wurde erstellt und deren Phänotyp in der Expression der Nitratreduktase (*narG-lip*) und der Nitritbildung untersucht. Überraschenderweise war *S. carnosus* m1 mit NreAB(H159Q)C weiterhin in der Lage, die Expression der Nitratreduktase positiv zu regulieren. Auch wenn die Expressionsstärke deutlich geringer war als die von wildtypischem NreABC so lag sie deutlich über dem Hintergrundniveau bei Abwesenheit von NreABC. Dies zeigt den regulatorischen Funktionserhalt des mutierten NreB-Proteins. Möglicherweise handelt es sich bei NreB(H159) nicht um die alleinige Phosphorylierungsstelle. Ein weiterer Histidinrest könnte an der Aktivierung des Sauerstoffsensors beteiligt sein.

Trotz der vorhandenen Genexpression der Nitratreduktase war *S. carnosus* m1 durch die Variante NreB(H159Q) nicht in der Lage, beim anaeroben Wachstum Nitrit zu bilden. Über die Konzentration an NreA, NreB und NreC sowie die der Nitratreduktase, der Nitritreduktase und des Nitrattransporters in der Zelle gibt es keine Informationen. Die Gene der regulatorischen Proteine NreABC werden sowohl zusammen mit den Genen der Nitratreduktase kotranskribiert, als auch über den eigenen Promotor. Wie für einen Sauerstoffsensor zu erwarten, erfolgt die Transkription bereits bei Anwesenheit von Sauerstoff (Fedtke *et al.*, 2002). Eventuell ist die Menge an Nitrattransporter, Nitrat- und Nitritreduktase im Stamm *S. carnosus* m1 NreAB(H159Q)C nicht ausreichend, um Nitrat aus dem Milieu in die Zelle zu transportieren, dort zu Nitrit zu reduzieren und dieses wieder aus der Zelle zu transportieren. Um zu klären, welcher Schritt nun tatsächlich durch die Variante betroffen ist, kann die externe Nitratkonzentration bestimmt werden. Bleibt sie während der Kultivierung konstant, so ist *S. carnosus* m1 NreAB(H159Q)C nicht in der Lage, Nitrat in die Zelle aufzunehmen und der Nitrattransporter liegt in zu geringer Konzentration vor. Nimmt sie während der Kultivierung jedoch ab, so liegt das Reduktionsdefizit bei der intrazellulären Reduktion; die Nitratreduktase wäre betroffen.

Eine weitere Erklärung ist, dass die NreB-Aktivität neben NreA und Sauerstoff noch durch einen weiteren Faktor beeinflusst wird. So wird in *Pseudomonas aeruginosa* die Aktivität des

Zweikomponentensystems GacSA durch ein Netzwerk von Sensorkinasen reguliert: Während LadS die Autophosphorylierung von GacS fördert (Ventre *et al.*, 2006; Chambonnier *et al.*, 2016), wird GacS durch RetS gehemmt (Francis *et al.*, 2018). RetS wird wiederum durch PA1611 gehemmt, wodurch dessen Hemmung von GacS aufgehoben wird (Kong *et al.*, 2013; Bhagirath *et al.*, 2017). Eine Aktivierung von NreB, die unabhängig von der Phosphorylierung von NreB(H159) erfolgt, könnte auch die aerobe Aktivität im ON-Phänotyp erklären.

6. Literatur

- Albanesi, D., Martín, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M., Haouz, A., Alzari, P., de Mendoza, D. und Buschiazzi, A. (2009) Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:16185-16190.
- Alex, L. und Simon, M. (1994) Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet* **10**: 133-138.
- Appleby, J. und Bourret, R. (1998) Proposed signal transduction role for conserved CheY residue Thr87, a member of the response regulator active-site quintet. *J Bacteriol* **180**:3563-3569.
- Barakat, M., Ortet, P. und Whitworth, D. (2011) P2CS: a database of prokaryotic two-component systems. *Nucleic Acids Res* **39**: D771-776.
- Barbieri, C. und Stock, A. (2008) Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both *in vitro* and *in vivo* using Phos-tag-based reagents. *Anal Biochem* **376**:73-82.
- Bhagirath, A., Pydi, S., Li, Y., Lin, C., Kong, W., Chelikani, P. und Duan, K. (2017) Characterization of the Direct Interaction between Hybrid Sensor Kinases PA1611 and RetS That Controls Biofilm Formation and the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect Dis* **3**:162-175.
- Bornhorst, J. und Falke, J. (2003) Quantitative analysis of aspartate receptor signaling complex reveals that the homogeneous two-state model is inadequate: development of a heterogeneous two-state model. *J Mol Biol* **326**:1597-1614.
- Bourret, R. (2010) Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Curr Opin Microbiol* **13**:142-149.
- Bradford, M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brückner, R. (1992) A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Gene* **122**: 187-192.
- Buelow, D. und Raivio, T. (2010) Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol* **75**:547-566.
- Carmany, D., Hollingsworth, K. und McCleary, W. (2003) Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *J Bacteriol* **185**:1112–1115.
- Casino, P., Rubio, V. und Marina, A. (2009) Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **139**:325-336.
- Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M., de Bentzmann, S. und Bordi, C. (2016) The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* **12**:e1006032. doi: 10.1371/journal.pgen.1006032.
- Chamnongpol, S., Cromie, M. und Groisman, E. (2003) Mg²⁺ sensing by the Mg²⁺ sensor PhoQ of *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* **325**:795–807.
- Diaz, A., Stephenson, S., Green, J., Levnikov, V., Wilkinson, A. und Perego, M. (2008) Functional role for a conserved aspartate in the Spo0E signature motif involved in the dephosphorylation of the *Bacillus subtilis* sporulation regulator Spo0A. *J Biol Chem* **283**:2962–2972.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.

- Drapal, N. und Sawers, G. (1995) Purification of ArcA and analysis of its specific interaction with the *pfl* promoter-regulatory region. *Mol Microbiol* **16**:597-607.
- Farinha, M. A. und Kropinski, A. M. (1990) High Efficiency Electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* Using Frozen Cell Suspensions. *FEMS Microbiol Lett* **58**: 221-225.
- Fast, B., Lindgren, P.-E. und Götz, F. (1997) Cloning, sequencing, and characterization of a gene (*narT*) encoding a transport protein involved in dissimilatory nitrate reduction in *Staphylococcus carnosus*. *Arch Microbiol* **166**: 361-367.
- Fedtke, I., Kamps, A., Krismer, B. und Götz, F. (2002) The Nitrate Reductase and Nitrite Reductase Operons and the *narT* Gene of *Staphylococcus carnosus* Are Positively Controlled by the Novel Two-Component system NreBC. *J Bacteriol* **184**: 6624-6634.
- Finn, R., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J., Gavin, O., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E., Eddy, S. und Bateman, A. (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38**:D211-222.
- Fish, W.W. (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* **158**: 357-364.
- Francis, V., Waters, E., Finton-James, S., Gori, A., Kadioglu, A., Brown, A. und Porter, S. (2018) Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* **9**:2219. doi: 10.1038/s41467-018-04640-8.
- Froger, A. und Hall, J. (2007) Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp* **6**:253.
- Frunzke, J., Gätgens, C., Brocker, M. und Bott, M. (2011) Control of heme homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* by the two-component system HrrSA. *J Bacteriol* **193**:1212-1221.
- Gao, R. und Stock A. (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**:133-154.
- Georgellis, D., Kwon, O. und Lin, E. (2001) Quinones as the redox signal for the *arc* two-component system of bacteria. *Science* **292**: 2314-2316.
- Götz, F., Popp, F., Korn, E. und Schleifer, K.H. (1985) Complete nucleotide sequence of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Staphylococcus carnosus*. *Nucleic Acids Res* **13**: 5895-5906.
- Götz, F. und Schumacher, B. (1987) Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol Lett* **40**: 285-288.
- Grebe, T. und Stock, J. (1999) The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol* **41**: 139-227.
- Green, J. und Paget, M. (2004) Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* **2**: 954-966.
- Gunsalus, R. (1992) Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes. *J Bacteriol* **174**: 7069-7074.
- Handel, S. (2013) Das Dreikomponentensystem NreABC - Dimerisierungs- und Expressionstudien an *Staphylococcus carnosus* NreA. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Hentschel, E., Mack, C., Gätgens, C., Bott, M., Brocker, M. und Frunzke, J. (2014) Phosphatase activity of the histidine kinases ensures pathway specificity of the ChrSA and HrrSA two-component systems in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **92**:1326-1342.
- Hess, J., Bourret, R. und Simon, M. (1988) Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature* **336**:139-143.
- Heyer, A., Gätgens, C., Hentschel, E., Kalinowski, J., Bott, M. und Frunzke, J. (2012) The two-component system ChrSA is crucial for haem tolerance and interferes with HrrSA in

- haem-dependent gene regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **158**:3020-3031.
- Huynh, T.N., Noriega, C.E., and Stewart, V. (2010) Conserved mechanism for sensor phosphatase control of two-component signaling revealed in the ni-trate sensor NarX. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 21140-21145.
- Huynh, T. und Stewart, V. (2011) Negative control in two-component signal transduction by transmitter phosphatase activity. *Mol Microbiol* **82**(2): 275-286.
- Igo, M., Ninfa, A., Stock, J. und Silhavy, T. (1989) Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes Dev* **3**:1725-1734.
- Iuchi, S. und Lin, E.C. (1993) Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol Microbiol* **9**: 9-15.
- Jagadeesan, S., Mann, P., Schink, C. und Higgs, P. (2009) A novel "four-component" two-component signal transduction mechanism regulates developmental progression in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* **284**:21435-21445.
- Jeong, D., Cho, H., Jones, M., Shatzkes, K., Sun, F., Ji, Q., Liu, Q., Peterson, S., He, C. und Bae, T. (2012) The auxiliary protein complex SaePQ activates the phosphatase activity of sensor kinase SaeS in the SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **86**:331-348.
- Jiang, P., Atkinson, M., Srisawat, C., Sun, Q. und Ninfa, A. (2000) Functional dissection of the dimerization and enzymatic activities of *Escherichia coli* nitrogen regulator II and their regulation by the PII protein. *Biochemistry* **39**:13433–13449.
- Jiang, P. und Ninfa, A. (2009) Alpha-ketoglutarate controls the ability of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein to regulate the activities of NRII (NrB but does not control the binding of PII to NRII. *Biochemistry* **48**:11514–11521.
- Kamps, A., Achebach, S., Fedtke, I., Unden, G. und Götz, F. (2004) Staphylococcal NreB: an O₂-sensing histidine protein kinase with an O₂-labile iron-sulphur cluster of the FNR type. *Mol Microbiol* **52**:713-723.
- Keener, J. und Kustu, S. (1988) Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:4976-4980.
- Kempf, M., Theobald, U. und Fiedler, H. (1999) Economic improvement of the fermentative production of gallidermin by *Staphylococcus gallinarum*. *Biotechnol Lett* **21**: 663-667.
- Khoroshilova, N., Beinert, H., und Kiley, P.J. (1995) Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2499-2503.
- Klein, R. (2018) Dephosphorylierungs- und Interaktionsstudien im NreABC-System von *Staphylococcus carnosus*. Masterarbeit. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Koch-Singenstreu, M. (2013) Das GAF-Domänen-Protein NreA - ein neuartiger Nitratrezeptor aus *Staphylococcus carnosus*. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Kong, W., Chen, L., Zhao, J., Shen, T., Surette, M., Shen, L. und Duan, K. (2013) Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Mol Microbiol* **88**:784-797.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lin, E.C. und Iuchi, S. (1991) Regulation of gene expression in fermentative and respiratory systems in *Escherichia coli* and related bacteria. *Annu Rev Genet* **25**:361-387.

- Löfblom, J., Kronqvist, N., Uhlén, M., Stahl S. und Wernerus, H. (2006): Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism. *J Appl Microbiol* **102**: 736-747.
- Löfblom, J., Rosenstein, R., Nguyen, M., Ståhl, S. und Götz, F. (2017) *Staphylococcus carnosus*: from starter culture to protein engineering platform. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**:8293-8307.
- Lukat, G., Stock, A. und Stock, J. (1990) Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry* **29**: 5436-5442.
- Lukat, G., Lee, B., Mottonen, J., Stock, A. und Stock, J. (1991) Roles of the Highly Conserved Aspartate and Lysine Residues in the Response Regulator of Bacterial Chemotaxis. *J Biol Chem* **266**: 8348-8354.
- Lukat, G., McCleary, W., Stock, A. und Stock, J. (1992) Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(2): 718-722.
- McLaughlin, K.J., Strain-Damerell, C.M., Xie, K., Brekasis, D., Soares, A.S., Paget, M.S., and Kielkopf, C.L. (2010) Structural basis for NADH/NAD⁺ redox sensing by a Rex family repressor. *Mol Cell* **38**: 563-575.
- Möglich, A., Ayers, R. und Moffat, K. (2009a) Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *J Mol Biol* **385**:1433–1444.
- Müllner, M., Hammel, O., Mienert, B., Schlag, S., Bill, E. und Unden, G. (2008) A PAS domain with an oxygen labile [4Fe-4S]⁽²⁺⁾ cluster in the oxygen sensor kinase NreB of *Staphylococcus carnosus*. *Biochemistry* **47**: 13921-13932.
- Müllner, M. (2008) Biochemische Charakterisierung des O₂-Sensors NreB aus *Staphylococcus carnosus*. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Needham, J., Chen, T. und Falke, J. (1993) Novel ion specificity of a carboxylate cluster Mg(II) binding site: strong charge selectivity and weak size selectivity. *Biochemistry* **32**:3363-3367.
- Neubauer, H. und Götz, F. (1996) Physiology and Interaction of Nitrate and Nitrite Reduction in *Staphylococcus carnosus*. *J Bacteriol* **178**: 2005-2009.
- Neubauer, H., Pantel, I. und Götz, F. (1999) Molecular Characterization of the Nitrite-Reducing System of *Staphylococcus carnosus*. *J Bacteriol* **181**: 1481-1488.
- Nicholas, D. und Nason, A. (1957) Determination of Nitrate and Nitrite. *Methods Enzymol* **3**:981-984.
- Niemann, V., Koch-Singenstreu, M., Neu, A., Nilkens, S., Götz, F., Unden, G. und Stehle, T. (2014) The NreA protein functions as a nitrate receptor in the staphylococcal nitrate regulation system. *J Mol Biol* **426**:1539-1553.
- Nilkens, S. (2013) The NreABC system of *Staphylococcus carnosus* combines nitrate and oxygen sensing by an NreA/NreB sensor complex. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Nilkens, S., Koch-Singenstreu, M., Niemann, V., Götz, F., Stehle, T. und Unden, G. (2014) Nitrate/oxygen co-sensing by an NreA/NreB sensor complex of *Staphylococcus carnosus*. *Mol Microbiol* **91**:381-393.
- Ninfa, A. und Magasanik, B. (1986) Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:5909-5913.
- Noriega, C., Lin, H., Chen, L., Williams, S. und Stewart, V. (2010) Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **75**:394-412.

- Pantel, I., Lindgren, P.-E., Neubauer, H. und Götz, F. (1998) Identification and characterization of the *Staphylococcus carnosus* nitrate reductase operon. *Mol Gen Genet* **259**: 105-114.
- Parashar, V., Mirouze, N., Dubnau, D. und Neiditch, M. (2011) Structural basis of response regulator dephosphorylation by Rap phosphatases. *PLoS Biol* **9**(2):e1000589. doi: 10.1371/journal.pbio.1000589.
- Parkinson, J. und Kofoed, E. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* **26**: 71-112.
- Pazy, Y., Motaleb, M., Guarnieri M., Charon, N., Zhao, R. und Silversmith R. (2010) Identical phosphatase mechanisms achieved through distinct modes of binding phosphoprotein substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 1924-1929.
- Pioszak, A. und Ninfa, A. (2003b) Mechanism of the PII-activated phosphatase activity of *Escherichia coli* NRII (NtrB): how the different domains of NRII collaborate to act as a phosphatase. *Biochemistry* **42**:8885-8899.
- Pioszak, A. und Ninfa, A. (2004) Mutations altering the N-terminal receiver domain of NRI (NtrC) That prevent dephosphorylation by the NRII-PII complex in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:5730-40.
- Porter, S. und Armitage, J. (2002) Phosphotransfer in *Rhodobacter sphaeroides* chemotaxis. *J Mol Biol* **324**:35-45.
- Pratt, L. und Silhavy, T. (1995) Porin regulation of *Escherichia coli*. In: Hoch, J. und Silhavy, T. editors. Two-component signal transduction. Washington D.C: ASM Press pp. 105–127.
- Reinhart, F., Huber, A., Thiele, R. und Uden, G. (2010) Response of the Oxygen Sensor NreB to Air *In Vivo*: Fe-S-Containing NreB and Apo-NreB in Aerobically and Anaerobically Growing *Staphylococcus carnosus*. *J Bacteriol* **192**: 86-93.
- Rosenstein, R., Peschel, A., Wieland, B.und Götz, F. (1992) Expression and regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosus* plasmid pSX267. *J Bacteriol* **174**: 3676-3683.
- Rosenstein, R., Nerz, C., Biswas, L., Resch, A., Raddatz, G., Schuster, S. und Götz, F. (2009) Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. *Appl Environ Microbiol* **75**:811-822.
- Russo, F. und Silhavy, T. (1991) EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J Mol Biol* **222**:567-580.
- Sambrook, J. und Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: a laboratory manual (Third Edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, D., Gillece-Castro, B., Stock, A., Burlingame, A. und Koshland, D. Jr. (1989) Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J Biol Chem* **264**:21770-21778.
- Schlag, S. (2008) Dissimilatory nitrate and nitrite reduction in staphylococci: regulation and implication in biofilm formation. Dissertation. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Schlag, S., Fuchs, S., Nerz, C., Gaupp, R., Engelmann, S., Liebeke, M., Lalk, M., Hecker, M. und Götz, F. (2008) Characterization of the oxygen-responsive NreABC regulon of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **190**: 7847-7858.
- Schleifer, K.H. und Fischer, U. (1982) Description of a New Species of the Genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int J Syst Bacteriol* **32**: 153-156.
- Sheeler, N., MacMillan, S. und Nodwell, J. (2005) Biochemical activities of the absA two-component system of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **187**:687–696.
- Silversmith, R. (2010) Auxiliary phosphatases in two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **13**: 177–183.

- Simms, S., Keane, M. und Stock, J. (1985) Multiple forms of the CheB methylesterase in bacterial chemosensing. *J Biol Chem* **260**:10161-10168.
- Siraporn, A., Perchuk, B., Laub, M. und Goulian, M. (2010) Evolving a robust signal transduction pathway from weak cross-talk. *Mol Syst Biol* **6**:452.
- Stewart, V. (1993) Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **9**:425-434.
- Stewart, R. (2010) Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways. *Curr Opin Microbiol* **13**:133-141.
- Stewart, V. und Chen L-L. (2010) The S helix mediates signal transmission as a HAMP domain coiled-coil extension in the NarX nitrate sensor from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **192**:734-745.
- Stewart, V. und Rabin, R.S. (1995) In: *Two-component Signal Transduction*, Hoch, J.A. and Silhavy, T.J. (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 233-252.
- Stock, J., Ninfa, A. und Stock, A. (1989) Protein Phosphorylation and Regulation of Adaptive Responses in Bacteria. *Microbiol Rev* **53**: 450-490.
- Stock, A., Robinson, V. und Goudreau, P. (2000) Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Stookey, L.L (1970) Ferrozine-a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem* **42**: 779-781.
- Strohmaier, H., Noiges, R., Kotschan, S., Sawers, G., Högenauer, G., Zechner, E. und 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, F. und Moffatt, B. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**:113-130.
- Sun, J., Zheng, L., Landwehr, C., Yang, J. und Ji, Y. (2005) Identification of a novel essential two-component signal transduction system, YhcSR, in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **187**:7876-7880.
- Sun, F., Ji, Q., Jones, M., Deng, X., Liang, H., Frank, B., Telser, J., Peterson, S., Bae, T. und He, C. (2012) AirSR, a [2Fe-2S] cluster-containing two-component system, mediates global oxygen sensing and redox signaling in *Staphylococcus aureus*. *J Am Chem Soc* **134**:305-314.
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, re-dox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 479-506.
- Uden, G., Bongaerts, J., Becker, S., Holighaus, G., Schirawski, J. und Six, S. (1995) O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch Microbiol* **164**: 81-90.
- Uden, G. und Bongaerts, J. (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* **1320**: 217-234.
- van Oort, M.G., Deveer, A.M., Dijkman, R., Tjeenk, M.L., Verheij, H.M., de Haas, G.H., et al. (1989) Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* **28**:9278-9285.
- Ventre, I., Goodman, A., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S. und Filloux, A. (2006) Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:171-176.

- Wackwitz, B., Bongaerts, J., Goodman, S. und Uden, G. (1999) Growth phase-dependent regulation of *nuoA-N* expression in *Escherichia coli* K-12 by the Fis protein: upstream binding sites and bioenergetic significance. *Mol Gen Genet* **262**:876-883.
- Wackwitz, B. (1999) Transcriptional regulation of the NADH dehydrogenase I (*nuoA-N* operon) in *Escherichia coli* by ArcA, Fis and IHF. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S. und Eisenbach, M. (1993) Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8787-8791.
- West, A. und Stock, A. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**:369-76.
- Willett, J. und Kirby, J. (2012) Genetic and biochemical dissection of a HisKA domain identifies residues required exclusively for kinase and phosphatase activities. *PLoS Genet* **8**(11):e1003084. doi: 10.1371/journal.pgen.1003084.
- Williams, S. und Stewart, V. (1997) Nitrate- and nitrite-sensing protein NarX of *Escherichia coli* K-12: mutational analysis of the amino-terminal tail and first transmembrane segment. *J Bacteriol* **179**:721-729.
- Wolanin, P., Webre, D. und Stock, J. (2003) Mechanism of Phosphatase Activity in the Chemotaxis Response Regulator CheY. *Biochemistry* **42**: 14075-14082.
- Yan, M., Yu, C., Yang, J. und Ji, Y. (2011) The essential two-component system YhcSR is involved in regulation of the nitrate respiratory pathway of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **193**:1799-1805.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Zhao, R., Collins, E., Bourret, R. und Silversmith, R. (2002) Structure and catalytic mechanism of the *E. coli* chemotaxis phosphatase CheZ. *Nat Struct Biol* **9**:570-575.
- Zhu, X., Rebello, J., Matsumura, P. und Volz, K. (1997) Crystal structures of CheY mutants Y106W and T87I/Y106W. CheY activation correlates with movement of residue 106. *J Biol Chem* **272**:5000-5006.
- Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T. und Inouye, M. (2000) Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:7808-7813.
- Zientz, E., Bongaerts, J. und Uden, G. (1998) Fumarate Regulation of Gene Expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR* Genes) Two-Component Regulatory System. *J Bacteriol* **180**: 5421-5425.

I Anhang

I.1 Anhang zu Material und Methode

Chemikalien	Hersteller
Agar-Agar Kobe I	Carl Roth
Agarose NEEQ Ultra-Qualität	Carl Roth
Ammoniumacetat	RPR
Ammoniumeisen(III)citrat	Carl Roth
Ampicillin (Dinatriumsalz)	Carl Roth
AHT (Anhydrotetracyclin)	Acros
APS (Ammoniumperoxosulfat)	Fluka
ATP (Dinatriumsalz)	Carl Roth
L(+)-Ascorbinsäure	Carl Roth
D(+)-Biotin	Carl Roth
Bromphenolblau	Janssen Chimica
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl Roth
CaCl ₂ (Dihydrat)	AppliChem
Carbamoylphosphat (Dilithiumsalz)	Sigma
Chloramphenicol	Fluka
Coomassie Brilliant Blue-R250	Merck
Cysteinhydrochlorid (Monohydrat)	Carl Roth
D(+)-Desthiobiotin	Sigma
DMF (N,N-Dimethyl-Formamid)	Fluka
DMPD (N,N-Dimethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride)	Fluka
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma
EDTA (Dinatriumsalz Dihydrat)	Carl Roth
Erythromycin	Fluka
Essigsäure	Carl Roth
Essigsäure (>99 %)	Carl Roth
Ethanol (100 %)	Merck
FeCl ₃ (Hexahydrat)	Fluka
Ferrozin (Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]benzosulfonat)	Serva
[γ-33P]-ATP (SRF-301)	Hartmann Analytic
Glasperlen (Ø 0,1 mm)	Carl Roth
Glucose	Carl Roth
Glycerin (86 %)	Carl Roth
Glycin	AppliChem
HCl	Sigma
Hefeextrakt	Carl Roth
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Fluka
Imidazol	Carl Roth
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)	Thermo Fisher

Isopropanol	Carl Roth
Kanamycinsulfat	Carl Roth
KCl	Carl Roth
K ₂ HPO ₄	Carl Roth
KH ₂ PO ₄	Carl Roth
KMnO ₄	Janssen Chimica
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
MgCl ₂	Carl Roth
MgSO ₄	Carl Roth
MnCl ₂	Carl Roth
MOPS Pufferan (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
Na ₂ HPO ₄ (Dihydrat)	Carl Roth
Na ₂ S (Nonahydrat)	Sigma
NaH ₂ PO ₄ (Dihydrat)	Carl Roth
NaNO ₂	Fluka
NaNO ₃	Fluka
NaOH	Fluka
n-Butanol	Carl Roth
Neocuproin	Sigma
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Macherey-Nagel
N-(1-Naphtyl)ethylendiamindihydrochlorid	Fluka
PEG (Polyethylenglycol) 6000	Carl Roth
Phos-tag	Wako GmbH
p-Nitrophenylcaprylat	Sigma
RedSafe	iNtRON Biotechnology
Rotiphorese Gel 30 (37,5 : 1)	Carl Roth
Rotiquant	Carl Roth
D(+)-Saccharose	Carl Roth
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	AppliChem
SOB-Medium	Carl Roth
Strep-Tactin Sepharose	IBA Lifescience
Sulfanilamid	Merck
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Fluka
Tris Pufferan	Carl Roth
Triton X-100	Carl Roth
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth
Tween 20	Carl Roth
D(+)-Xylose	Sigma
Zinkacetat (Dihydrat)	Fluka
β-Mercaptoethanol	Carl Roth

Gerät/Zubehör	Typ	Hersteller
Anaerobenzelt	Typ A Kammer	Coy
Autoklav	VX-150	Tuttnauer Systec
Autoklav	2540 ELV	Tuttnauer Systec
Biophotometer	BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank	BD115 ATP-LIN	WTC Binder
Elektroporationsgerät	Eporator	Eppendorf
FrenchPress	FA078E1	Aminco
Flüssigszintillationszähler	LS6000 SC	Beckman
Gasflaschen	(N ₂ , Formiargas 95/5)	Westfalen AG
Geltrockner	PH-t 20	Biotec Fischer
Inkubationsschüttler	G25	New Brunswick Scientific
Inkubationsschüttler	Excella E24	New Brunswick Scientific
Inkubationsschüttler	innova 4000	New Brunswick Scientific
Magnetrührer	MR3000	Heidolph
Nitrat-Teststäbchen	MQuant	MerckMillipore
PCR-Thermocycler	MyCycler thermalcycler	BioRad
pH-Meter	Digital-pH-Meter	Knick
PhosphorImager Platte	Imaging Plate BAS 2040	Fujifilm
PhosphorImager	FLA-7000	Fujifilm
Photometer	EL808	BioTek
Saran-Wrap		Dow Chemical Company
SDS-PAGE System	Mini-Protean Tetra Cell	BioRad
O ₂ /H ₂ -Detektor	Model 10	Coy
Spannungsgerät	PowerPack 200	BioRad
Taumelschüttler	Duomax 1030	Heidolph
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge	mini-Spin plus	Eppendorf
UV/Vis-Photometer	UV-2450	Shimadzu
UV/Vis-Photometer	Ultraspec 2100 pro	Amersham Biosciences
Vakuumpumpe	Laboport	KNF Neuberger
Vortexer	Analog Vortex Mixer	VWR
Waage	PE626	Bosch
Waage	A 120 S	Sartorius Analytic
Wasserbad	1002	GF-L
Zellmühle	Vibrogen VI-4	Edmund Bühler
Zellmühle	Fast-Prep 24	MP
Zentrifuge	Avanti J-E	Beckman Coulter
Zentrifuge	Centrifuge 5403	Eppendorf

Internetseiten

Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Clustal Omega	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
DNA-Sequenzierung	http://www.lgcgenomics.com/ https://www.starseq.com/
ExPASy Proteomics Server	http://web.expasy.org/compute_pi/
Gene und Genome NCBI	http://www.genome.jp/kegg/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Oligonucl. Properties Calculator	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html
Proteindatenbank	https://www.uniprot.org/
Proteinfamilien	https://pfam.xfam.org/

I.2 Anhang zu Ergebnissen

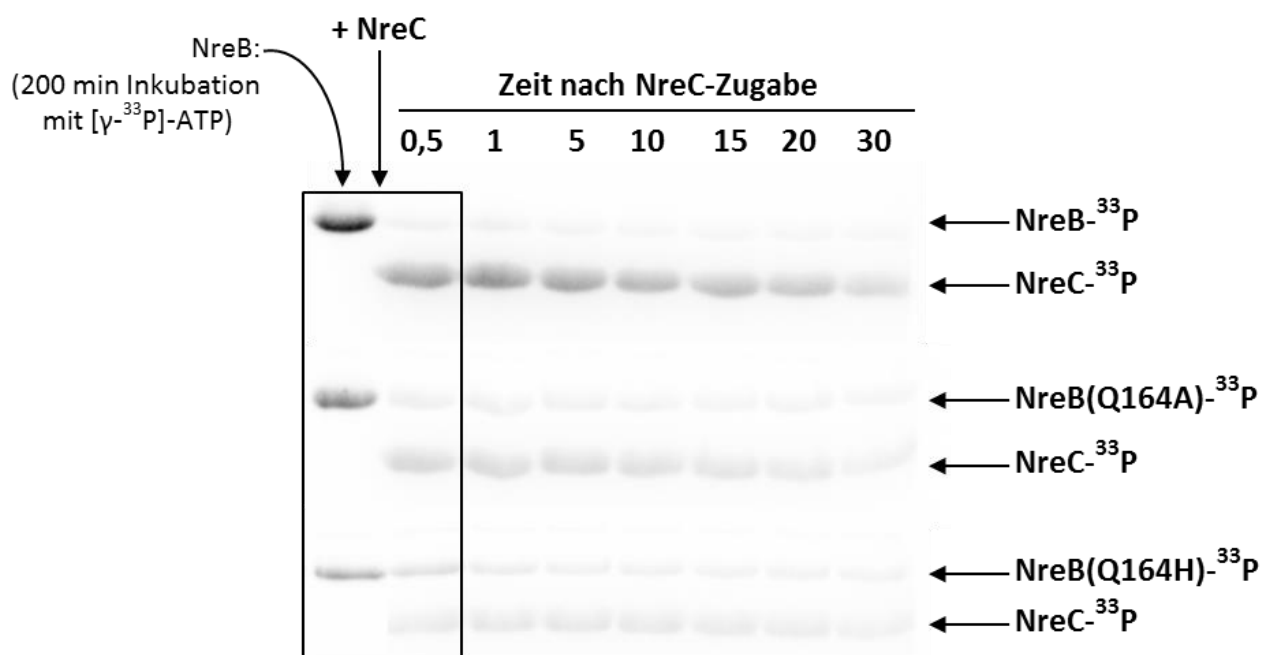


Abb. I-1: **Autoradiogramm vom Phosphotransfer** (unverändert) (vgl. Abb. 16)

II Lebenslauf

III Veröffentlichungen

Konferenzen und Poster:

- 03/2017 Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Würzburg
- 09/2016 A. Kretzschmar und G. Uden
The DxxxQ phosphatase motif in the O₂ sensor kinase NreB of *Staphylococcus carnosus*
31st Conference on Mechanism of Gene Regulation, Bad Bergzabern
- 03/2016 Poster: A. Kretzschmar, S. Nilkens und G. Uden
The DxxxQ phosphatase motif of the oxygen sensor kinase NreB of *Staphylococcus carnosus*
Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jena
- 06/2015 Poster: A. Kretzschmar, S. Nilkens, M. Koch-Singenstreu und G. Uden
Control of activity and FeS stability in the O₂-sensor NreB of *Staphylococcus carnosus*
- 10/2014 Poster: A. Kretzschmar, S. Nilkens und G. Uden
The DxxxQ phosphatase motif of the oxygen sensor NreB of *Staphylococcus carnosus*
30th Conference on Mechanism of Gene Regulation, Düsseldorf

IV Danksagung

V Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst angefertigt wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, Februar 2019