

**Struktur-Funktionsbeziehungen  
der FhIA- und HydH/G-Regulationssysteme  
in *Escherichia coli***

Dissertation  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Susanne Leonhartsberger  
München  
Februar 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Schmieger

Tag der mündlichen Prüfung: 28. März 2001

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1. Signaltransduktion in Bakterien</b>	<b>1</b>
1.1. Das Prinzip der Zwei-Komponenten-Systeme	1
1.2. Besonderheiten und Ausnahmen bei Zwei-Komponenten-Systemen von <i>E. coli</i>	2
1.3. Universalität der Zwei-Komponenten-Systeme	4
<b>2. <math>\sigma^{54}</math>-abhängige Transkription</b>	<b>5</b>
2.1. Mechanismus der $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkription	5
2.2. Domänenstruktur von $\sigma^{54}$ -abhängigen Regulatorproteinen	6
<b>3. Funktion und Regulation der Hydrogenasen von <i>E. coli</i></b>	<b>8</b>
3.1. Hydrogenase 1 und 2	8
3.2. Hydrogenase 3 als Teil des Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplexes von <i>E. coli</i>	9
<b>4. Ziel dieser Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>15</b>
<b>1. Mikrobiologische Methoden</b>	<b>15</b>
1.1. Bakterienstämme	15
1.2. Anzucht von Bakterien	16
1.3. Physiologischer Test auf Gasbildung	17
1.4. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	17
<b>2. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>17</b>
2.1. Oligonukleotide	17
2.2. Plasmide	19
2.3. Standardmethoden zur Analyse und Modifikation von DNA	20
2.4. Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.5. DNA/DNA Hybridisierung (Southern Blot)	21
<b>3. Biochemische Methoden</b>	<b>21</b>
3.1. Standardmethoden zur Analyse von Proteinen	21
3.2. Bestimmung der relativen Molekülmasse durch Gelfiltration	22
3.3. Markierung von Zellextrakten und Auftrennung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese	22
3.4. Reinigung von Proteinen	23
3.4.1. Reinigung von FhIA	23

3.4.2. Reinigung von FhIA-C	23
3.4.3. Reinigung von HydG	24
3.5. Bestimmung von Enzymaktivitäten	24
3.5.1. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität	24
3.5.2. Bestimmung der ATPase-Aktivität	25
3.5.3. Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität	25
3.6. Analyse von Protein-DNA-Interaktionen	25
3.6.1. Gelretardationsexperimente	25
3.6.2. DNase I Footprinting-Analyse	26
3.7. Limitierte Trypsinolyse	28
<b>4. Immunoblot-Analysen</b>	<b>28</b>
<b>5. Datenverarbeitung</b>	<b>29</b>
<b>ERGEBNISSE</b>	<b>30</b>
<b>A Untersuchungen zur Domänenstruktur von FhIA</b>	<b>30</b>
<b>1. Aktivität von FhIA-C (Aminosäuren 379 bis 693 von FhIA)</b>	<b>30</b>
1.1. Klonierung von <i>fhIA-C</i>	30
1.2. Konstitutive Transkriptionsaktivierung durch FhIA-C	30
1.2.1. Auswirkung von anaeroben Bedingungen und Formiat auf die <i>in vivo</i> -Aktivität von FhIA-C	30
1.2.2. Einfluß von überproduziertem HycA auf die Transkriptionsaktivierung durch FhIA-C	31
1.3. Reinigung von FhIA-C	32
1.4. ATPase-Aktivität von FhIA-C	34
<b>2. Untersuchungen zur Domänenstruktur durch limitierte Proteolyse</b>	<b>35</b>
<b>B Verbreitung des Formiat-Regulons in Organismen der Familie der Enterobacteriaceae</b>	<b>38</b>
<b>1. Vorkommen von FhIA in verschiedenen Enterobakterien</b>	<b>38</b>
<b>2. Sequenzvergleich der orthologen FhIA-Proteine aus <i>K. oxytoca</i>, <i>E. aerogenes</i> und <i>S. typhimurium</i> mit FhIA aus <i>E. coli</i></b>	<b>41</b>
<b>3. Aktivität von FhIA<sub>Ea</sub> und FhIA<sub>Ko</sub></b>	<b>45</b>
3.1. Stimulation der Aktivität von FhIA <sub>Ea</sub> und FhIA <sub>Ko</sub> durch Formiat und Anaerobiose	45
3.2. Einfluß von HycA <sub>Ec</sub> auf die Aktivität von FhIA <sub>Ea</sub> und FhIA <sub>Ko</sub>	46

<b>4. Überproduktion und Untersuchung der Löslichkeit von FhIA<sub>Ea</sub> und FhIA<sub>Ko</sub></b>	<b>47</b>
<b>C Untersuchungen zur Aktivität und Funktion des Zwei-Komponenten-Systems HydH/G</b>	<b>49</b>
<b>1. "Cross-talk" des Zwei-Komponenten-Systems HydH/G mit dem Formiat-Regulon</b>	<b>49</b>
1.1. Klonierung und Sequenzierung von <i>hydG<sub>Ko</sub></i> und <i>hydH<sub>Ko</sub></i>	49
1.2. Klonierung von <i>hydG<sub>Ec</sub></i> und Konstruktion von <i>hydH</i> - und <i>hydG</i> -Deletionsmutanten in <i>E. coli</i>	51
1.3. Aktivierung des Formiat-Regulons durch HydG <sub>Ko</sub>	52
1.4. Unspezifische Aktivierung der Expression von <i>hycA</i> durch HydG <sub>Ec</sub>	52
1.5. Einfluß von HydG auf die Synthese und Aktivität des FHL-Komplexes	54
<b>2. Reinigung und DNA-Bindung von HydG</b>	<b>55</b>
2.1. Reinigung von HydG und Kristallisationsversuche	55
2.2. Bindung von HydG an die <i>hydH/G</i> -upstream-Region	56
2.2.1. Gelretardationsexperimente	57
2.2.2. DNase I Footprinting-Analyse der <i>hydH/G</i> -upstream-Region	58
2.2.3. Untersuchung der <i>hydH/G</i> -upstream-region	59
<b>3. Aktivierung der Expression von <i>zraP</i> durch HydH/G</b>	<b>62</b>
3.1. Klonierung einer <i>zraP</i> '- <i>lacZ</i> -Genfusion	62
3.2. Spezifität der Regulation von <i>zraP</i> durch HydH/G	63
3.3. Zink und Blei als Induktoren der Expression von <i>zraP</i>	64
3.4. Abhängigkeit der Expressionsaktivierung von <i>zraP</i> vom alternativen Sigmafaktor $\sigma^{54}$	65
3.5. Anaerobe Expression von <i>zraP</i>	65
<b>4. Regulation von <i>hydH/G</i></b>	<b>66</b>
4.1. Autoregulation von <i>hydH/G</i>	66
4.2. Induktion durch verschiedene Metalle	67
4.3. $\sigma^{54}$ -Abhängigkeit der <i>hydH/G</i> -Expression	68
<b>5. Untersuchungen zur physiologischen Rolle des HydH/G-Zwei-Komponenten-Systems</b>	<b>68</b>
5.1. Einfluß von HydH/G auf die Zink-Toleranz der Zellen	68
5.2. Einfluß von HydH/G auf das Zellwachstum	69
5.3. Zeitlicher Verlauf der Induktion der HydG-abhängigen <i>zraP</i> -Expression durch Zink	70
5.4. Identifizierung von Proteinen, deren zelluläre Konzentration durch HydG beeinflusst wird, mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese	71

<b>DISKUSSION</b>	<b>74</b>
<b>1. Domänenstruktur und Wirkungsmechanismus des Transkriptionsaktivators FhIA</b>	<b>74</b>
<b>2. Unspezifische Aktivierung des <i>hyc</i>-Operons durch HydG</b>	<b>77</b>
<b>3. HydG als <math>\sigma^{54}</math>-abhängiger Transkriptionsaktivator von <i>zraP</i></b>	<b>79</b>
<b>4. Physiologische Rolle des HydH/G-Zwei-Komponenten-Systems</b>	<b>81</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>85</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>87</b>

## ABKÜRZUNGEN

AMP-PCP	Adenylyl-( $\beta,\gamma$ -methylen)-diphosphat
Ap	Ampicillin
bp	Basenpaar(e)
C-	carboxy-
Cm	Chloramphenicol
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
$E\sigma^{54}$	Komplex aus dem alternativen Sigmafaktor $\sigma^{54}$ und der RNA-Polymerase
FDH	Formiat-Dehydrogenase
FHL	Formiat-Hydrogen-Lyase
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Km	Kanamycin
MOPS	Kalium-Morpholinopropansulfonat
N-	amino-
$OD_x$	optische Dichte bei x nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonsäurefluorid
$R$	Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
$\sigma^{54}/\sigma^{70}$	Sigmafaktor 54 / 70
Tc	Tetracyclin
U	Unit(s)
UAS	upstream activating sequence
$X_{Ea}, X_{Ec}, X_{Ko}, X_{St}$	X von <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> (wenn nichts anderes vermerkt, bedeutet X: X von <i>Escherichia coli</i> )
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid





# EINLEITUNG

## 1. Signaltransduktion in Bakterien

Bakterien sind in ihrer natürlichen Umgebung häufig mit extrem wechselnden Umweltbedingungen konfrontiert. Zu diesen veränderlichen Parametern zählen einerseits physikalisch-chemische wie der Sauerstoffgehalt, die Osmolarität, die Temperatur, der pH-Wert der Umgebung und das Vorkommen von Nährstoffen und schädlichen Stoffen. Andererseits gehört auch das Auftreten von anderen Organismen dazu, die entweder als Konkurrenten, Symbiosepartner oder im Falle pathogener Bakterien als Wirte eine Rolle spielen. Diese äußeren Veränderungen erzwingen eine schnelle Anpassung, um Konkurrenzfähigkeit und Überleben der Mikroorganismen zu gewährleisten. Dieser Prozeß des adaptiven Verhaltens von Bakterien umfaßt wie jedes Informationsverarbeitungssystem verschiedene Stufen: Stimulusaufnahme, Signalweiterleitung und -verarbeitung, einschließlich Amplifikation und Integrierung verschiedener Signale, und Produktion der entsprechenden Output-Reaktionen. Diese Antwort kann eine veränderte Motilität der Mikroorganismen sein, in den allermeisten Fällen jedoch äußert sie sich in einer Modulation der Expression einzelner Gene, welche über eine Veränderung der Proteinproduktion die verschiedensten Effekte zur Folge haben kann (Parkinson, 1993).

### 1.1. Das Prinzip der Zwei-Komponenten-Systeme

Eine Vielzahl von bakteriellen Signaltransduktionssystemen besteht aus zwei Proteinen, nämlich einer Sensorkinase und einem Regulatorprotein, weshalb sie als Zwei-Komponenten-Systeme bezeichnet werden (Gross *et al.*, 1989). Sensorkinasen sind meist membrangebunden und nehmen Signale aus der Umgebung auf, die sie dann zum cytoplasmatisch lokalisierten Regulatorprotein weiterleiten, das wiederum die endgültige Reaktion bewirkt, beispielsweise eine Beeinflussung der Genexpression. Der Mechanismus der Signalweiterleitung erfolgt über Phosphatgruppentransfer (Mizuno, 1998). Die Aktivierung der Sensorkinase geschieht nach Signalaufnahme durch Autophosphorylierung. Den entsprechenden Phosphatrest überträgt das Protein schließlich auf das Regulatorprotein, wodurch dieses seinerseits aktiviert wird. Jedes der beiden Proteine weist im typischen Fall zwei funktionelle Domänen auf. Sensorkinasen besitzen eine Signal-sensierungs- oder Inputdomäne und eine Transmitterdomäne, die das Signal weiterleitet zum Regulator. Dieser besteht entsprechend aus einer Empfängerdomäne, die den Reiz von der Sensorkinase empfängt, und einer Regulator- oder Outputdomäne (Swanson *et al.*, 1994).

Die Signalsensierungsdomänen verschiedener Sensorproteine weisen große Unterschiede untereinander auf, entsprechend der unterschiedlichen Natur der sensierten Reize. Oft sind ihnen jedoch zwei Transmembranbereiche gemeinsam, zwischen denen auf der periplasmatischen Seite die eigentliche Signalaufnahme zum Beispiel durch Bindung von bestimmten Substanzen erfolgt. Die cytoplasmatische Transmitterdomäne dagegen ist innerhalb der verschiedenen Sensorkinasen relativ gut konserviert und hat typischerweise eine Länge von etwa 250 Aminosäuren (Swanson *et al.*, 1994). Sie besitzt fünf sehr konservierte Bereiche, von denen der am N-terminalen Ende gelegene einen unveränderlichen Histidin-Rest enthält, an welchem die Phosphorylierung des Proteins erfolgt. Die anderen Bereiche zeigen zum Teil Homologie mit ATP-Bindestellen und stellen das katalytische Zentrum dar. Sensorkinasen agieren normalerweise als Dimere, wobei sich die beiden Moleküle gegenseitig phosphorylieren (Alex und Simon, 1994).

Die Empfängerdomäne der Regulatorproteine ist normalerweise am N-Terminus des Proteins lokalisiert und hat eine Länge von etwa 120 Aminosäurenresten, wovon einer ein streng konserviertes Aspartat ist, welches das Substrat der Phosphorylierung durch die Sensorkinase ist. Die Outputdomäne enthält bei Regulatoren, die als Transkriptionsaktivatoren die Expression von Genen beeinflussen, ein DNA-Bindemotiv wie zum Beispiel ein Helix-Turn-Helix-Motiv.

### **1.2. Besonderheiten und Ausnahmen bei Zwei-Komponenten-Systemen von *E. coli***

Die Bestimmung der Gesamtsequenz des Genoms von *Escherichia coli* (Blattner *et al.*, 1997) machte eine systematische Suche nach Genen für Zwei-Komponenten-Systeme möglich. Es wurden 62 offene Leserahmen identifiziert, die Homologie zu Genen von Zwei-Komponenten-Systemen zeigen; dadurch stieg die Anzahl der orthodoxen Sensorkinasen auf 23, die der Regulatorproteine auf 32 an (Mizuno, 1997). Neben den klassisch aufgebauten Zwei-Komponenten-Systemen, wie zum Beispiel dem auf externe Osmolarität reagierenden System EnvZ-OmpR (einen Überblick geben Mizuno und Mizushima, 1990), existieren diverse Ausnahmen. So findet sich bei einigen Signaltransduktionsproteinen neben den oben beschriebenen klassischen Domänen eine weitere Domäne, die auch an der Signalweiterleitung beteiligt ist, die sogenannte HPT ("histidine-containing phosphotransfer")-Domäne (Ishige *et al.*, 1994; Übersicht in Appleby *et al.*, 1996). Zum Beispiel zeigt ArcB, die Sensorkinase des ArcA/B-Zwei-Komponenten-Systems, das an der Sensierung des Redoxzustandes und an der Regulation anaerober und aerober Stoffwechselwege beteiligt ist (Iuchi und Lin, 1993), einen sehr komplexen Aufbau. Das Protein enthält alle drei bekannten Typen von Signaldomänen in seiner Sequenz: eine Sensorkinase-spezifische

Transmitterdomäne mit konserviertem Histidin-Rest, eine Empfängerdomäne, wie sie normalerweise in Regulatorproteinen gefunden wird, und eine HPT-Domäne (Ishige *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, daß eine Phosphatgruppenübertragung in mehreren Schritten zuerst innerhalb von ArcB abläuft, bevor ein Transfer auf ArcA erfolgt. Ähnlich wie ArcB bestehen auch TorS, EvgS, BarA und RscC aus mehreren Signaldomänen; man nennt diese Proteine Hybrid-Sensorkinasen (Ishige *et al.*, 1994). Obwohl die meisten Sensorkinasen membrangebunden sind, gibt es auch einige lösliche Vertreter, die im Cytoplasma lokalisiert sind. Dazu gehört zum Beispiel NtrB, die Sensorkinase des Stickstoff-Assimilationssystems.

31 der 32 identifizierten Regulatorproteine von *E. coli* haben einen ähnlichen strukturellen Aufbau, in welchem eine Empfängerdomäne einer Outputdomäne vorangeht. Aufgrund der Ähnlichkeit der Outputdomänen werden sie in verschiedene Klassen eingeteilt (Mizuno, 1997). Eine Besonderheit unter den Regulatorproteinen stellt CheY dar, eine Komponente in der Signalkaskade der Chemotaxisregulation. Dieses Protein besitzt keine Outputdomäne. Im phosphorylierten Zustand interagiert CheY mit Proteinen an der Basis des Flagellenmotors, was eine Änderung der Drehrichtung der Flagellen bewirkt (Barak und Eisenbach, 1992).

Die Aktivierung von Regulatorproteinen durch Phosphorylierung wird in den meisten Fällen durch die Kinaseaktivität der entsprechenden Sensorkinasen vermittelt. Es konnte jedoch für einige Regulatorproteine gezeigt werden, daß sie *in vitro* auch durch niedermolekulare Phosphorylgruppendonoren wie Acetylphosphat phosphoryliert werden können (Lukat *et al.*, 1992; McCleary und Stock, 1994). Auch *in vivo* spielt die Aktivierung durch Acetylphosphat zum Teil eine wichtige Rolle (Bouche *et al.*, 1998).

Für die Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen ist nicht nur die Aktivierung, sondern auch die Deaktivierung von Regulatorproteinen entscheidend. Die Aspartat-Phosphat-Bindung in Regulatorproteinen ist ein metastabiles gemischtes Anhydrid, dessen nicht-enzymatische Hydrolyserate durch intrinsische Autophosphataseaktivität der Regulatorproteine verstärkt werden kann. In den meisten Fällen weisen auch die Sensorkinasen eine entsprechende Phosphataseaktivität auf und sind so nicht nur an der Aktivierung, sondern auch an der Deaktivierung der Regulatoren beteiligt (eine Übersicht bietet Perego und Hoch, 1996). Die Stabilität der Phosphat-Bindung weist bei den verschiedenen Regulationssystemen große Unterschiede auf, wobei die Halbwertszeiten zwischen wenigen Sekunden (CheY, NtrC, PhoB) und bis zu einer Stunde (OmpR, VirG, FrzE) variieren können (Bourret *et al.*, 1991).

In den meisten Fällen sind die Gene für Sensorkinase und Regulatorprotein im Chromosom von *E. coli* in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert, oft innerhalb eines

Operons (im Gegensatz zu *Synechocystis sp.* PCC 6803, in dessen Genom 60 % aller an Zwei-Komponenten-Systemen beteiligten Gene getrennt voneinander vorliegen (Mizuno *et al.*, 1996). Ausnahmen sind die Paare ArcA/B und NarQ/P, bei denen jeweils die einzelnen Komponenten an weit voneinander entfernten Stellen des Genoms codiert sind (Mizuno, 1997).

Der hohe Grad an Ähnlichkeit zwischen Sensor-kinasen einerseits und Regulatorproteinen andererseits innerhalb ein und derselben Zelle wirft die Frage auf, wie die Spezifität der einzelnen Regulationssysteme aufrechterhalten bleibt. Tatsächlich kommt es besonders in Fällen, in denen von außen in das System eingegriffen wird, zur Aktivierung eines Regulators durch eine unspezifische Sensor-kinase, einem Phänomen, das als "cross-talk" bezeichnet wird. *In vitro* wird dieses Phänomen sogar relativ häufig beobachtet (Igo *et al.*, 1989; Ninfa *et al.*, 1988). Allerdings wird auch *in vivo* "cross-talk" beobachtet, etwa im *pho*-Regulon (Fisher *et al.*, 1995), wo eine Aktivierung von PhoB nicht nur durch PhoR, sondern auch durch PhoM erfolgen kann. "Cross-talk" ist somit ein Sonderfall des als "cross-regulation" bezeichneten Effekts. "Cross-regulation", also die Regulation eines Zwei-Komponenten-Systems durch ein anderes Regulationssystem, kann außer durch Phosphorylierung eines Regulatorproteins durch eine Sensor-kinase eines anderen Regulationssystems ("cross-talk") auch durch eine andere kovalente Modifikation des Regulators oder Bindung eines Effektormoleküls erfolgen (Kox *et al.*, 2000). Es ist nicht endgültig geklärt, ob dies nicht zumindest in einigen Fällen schlicht auf "Fehler" durch Unspezifitäten zurückzuführen ist, jedoch mehren sich die Hinweise, daß "cross-regulation" eine wichtige Rolle in der globalen Regulation der Zelle spielt (Wanner, 1992).

### 1.3. Universalität der Zwei-Komponenten-Systeme

Obwohl die Zwei-Komponenten-Systeme ursprünglich bei Prokaryonten entdeckt wurden, sind sie entgegen früherer Annahmen nicht auf diese beschränkt. Auch bei Vertretern der Eukaryonten finden sie sich. In *Saccharomyces cerevisiae* beispielsweise wurde das Zwei-Komponenten-System *sln1p-ssk1p* (Singh, 2000) identifiziert, das offensichtlich in die Regulation der Antwort auf oxidativen Streß involviert ist. Auch in *Dictyostelium discoideum* (Schuster *et al.*, 1996) und *Neurospora crassa* wurden Gene identifiziert (Schumacher *et al.*, 1997), die an der Osmoregulation beteiligt sind und Homologie zu Domänen der Zwei-Komponenten-Systeme zeigen. Interessanterweise zeigt es sich, daß Zwei-Komponenten-Systeme in Eukaryonten auch mit den für diese Organismen typischen Regulationskaskaden der MAP-Kinasen verknüpft sein können (Maeda *et al.*, 1994; Singh, 2000). Auch in höheren Eukaryonten finden sich Proteine, die

Homologie zu bakteriellen Sensorkinasen zeigen, wie die in die Sensierung der Pflanzenhormone Ethylen und Cytokinin involvierten Proteine ETR1, ERS und CK11 von *Arabidopsis thaliana*. Im gleichen Organismus wurden auch Homologe zu Regulatorproteinen gefunden (Urao *et al.*, 2000).

Die Universalität des Prinzips der Zwei-Komponenten-Systeme wurde dann vollends offenkundig, als auch in verschiedenen Vertretern der Archaea, der dritten Domäne des Lebens, homologe Proteine gefunden wurden. So wurden in *Halobacterium salinarium*, einem halophilen Archaeon, Gene für ein CheA/Y Zwei-Komponenten-System identifiziert (Rudolph und Oesterhelt, 1996) und auch im Genom von *Methanobacterium thermoautotrophicum* finden sich Gene mit Homologie zu Sensorkinasen und Regulatorproteinen (Smith *et al.*, 1997).

## 2. $\sigma^{54}$ -abhängige Transkription

### 2.1. Mechanismus der $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkription

Der Prozess der Transkription in Bakterien wird dadurch moduliert, daß die RNA-Polymerase zur Initiation der Transkription einen Komplex mit einem weiteren Protein, dem sogenannten Sigmafaktor, eingehen muß. Es gibt verschiedene Sigmafaktoren, wobei die meisten ähnlich sind zu  $\sigma^{70}$ , dem für die Transkription von "housekeeping"-Genen verantwortlichen Faktor von *E. coli*. Davon abweichend bildet  $\sigma^{54}$  aufgrund seiner Struktur und auch seines Reaktionsmechanismus eine eigene Klasse von Sigmafaktoren (Merrick, 1993).  $\sigma^{54}$  bindet sequenzspezifisch an DNA und bewirkt, daß die RNA-Polymerase im Komplex mit  $\sigma^{54}$  ( $E\sigma^{54}$ ) bestimmte Promotoren erkennt. Diese weisen eine sehr definierte -12/-24-Konsensussequenz, nämlich YTG**GC**ACG-N<sub>4</sub>-TT**GC**W auf (Barrios *et al.*, 1999).  $E\sigma^{54}$  bindet an die Promotorregion und bildet einen stabilen geschlossenen Komplex, ist also nicht in der Lage, die doppelsträngige DNA lokal aufzuschmelzen (Buck *et al.*, 2000). Für den Übergang in den offenen Komplex ist ein weiteres Protein nötig, ein  $\sigma^{54}$ -abhängiger Transkriptionsaktivator, der diese Isomerisierung katalysiert (Kustu *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1997).  $\sigma^{54}$  kann in diesem Sinne als "unvollständiger" Sigmafaktor bezeichnet werden, da er allein nicht in der Lage ist, die Transkriptionsinitiation durch die RNA-Polymerase zu bewirken (Morett und Segovia, 1993).

$\sigma^{54}$ -abhängige Transkriptionsaktivatoren besitzen Nukleotid-Bindestellen und zeigen ATP-Hydrolyse-Aktivität, welche die für die Isomerisierung des Komplexes nötige Energie bereitstellen könnte (Wedel und Kustu, 1995; Weiss *et al.*, 1991). Außerdem weisen  $\sigma^{54}$ -

abhängige Transkriptionsaktivatoren eine DNA-Bindesequenz auf, meist ein Helix-Turn-Helix-Motiv. Sie binden an spezifische DNA-Sequenzen, die sich für gewöhnlich upstream der von ihnen regulierten  $\sigma^{54}$ -Promotoren befinden, und daher "upstream activating sequences" (UAS) genannt werden (Kustu *et al.*, 1989). Diese UAS befinden sich in der Regel zwischen -100 und -200 Basenpaare upstream des Transkriptionsstartpunktes (Kustu *et al.*, 1991). In jüngster Zeit konnten jedoch auch Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die downstream des regulierten Gens lokalisiert sind (Belitsky und Sonenshein, 1999). Die an die UAS gebundenen  $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren interagieren mit dem an den Promotor gebundenen Komplex  $E\sigma^{54}$ . Hierfür ist eine Schleifenbildung der dazwischenliegenden DNA nötig, was in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen werden konnte (Su *et al.*, 1990). Diese Schleifenbildung der DNA wird in vielen Fällen durch die Bindung von DNA-bindenden und -biegenden Proteinen, etwa IHF (integration host factor) oder das HU-Protein erleichtert (Hoover *et al.*, 1990; Pérez-Martín und de Lorenzo, 1995a).

Der an den einzelnen  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren ablaufende Reaktionsmechanismus ist sehr ähnlich, dagegen sind die Proteine, deren Gene von  $E\sigma^{54}$  transkribiert werden, an ganz unterschiedlichen Prozessen in der Zelle beteiligt. Dazu gehören zum Beispiel Stickstoff-Fixierung in *Klebsiella pneumoniae*, Alginate-Produktion in *Pseudomonas aeruginosa*, Aromaten-Katabolismus in *Pseudomonas putida*, und Stickstoffassimilation in verschiedenen Enterobakterien (Übersicht in Shingler, 1996).

## 2.2. Domänenstruktur von $\sigma^{54}$ -abhängigen Regulatorproteinen

Sequenzanalysen haben ergeben, daß  $\sigma^{54}$ -abhängige Transkriptionsaktivatoren einen konservierten Aufbau aus drei Domänen besitzen (Morett und Segovia, 1993). Die zentrale Domäne C besteht in der Regel aus 240 Aminosäuren und zeigt den höchsten Ähnlichkeitsgrad der einzelnen Domänen. In ihr ist die ATP-Bindestelle lokalisiert; darüberhinaus konnten Regionen identifiziert werden, welche mit  $E\sigma^{54}$  interagieren. Die C-terminale Domäne D weist in den meisten Fällen eine Länge von 65 bis 130 Aminosäuren auf und trägt das DNA-Bindemotiv. Die Struktur der DNA-Bindedomäne einer mutierten Form des Transkriptionsaktivators NtrC konnte kürzlich mittels NMR-Spektroskopie gelöst werden (Pelton *et al.*, 1999). Eine flexible Linker-Region B trennt den Rest des Transkriptionsaktivators von der N-terminalen Domäne A, welche die am wenigsten konservierte und am variabelsten hinsichtlich ihrer Länge ist. Hier findet die Aktivierung der  $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren statt. Die große Variabilität dieser Domäne ist auf unterschiedliche

Aktivierungsmechanismen und Stimuli zurückzuführen. Nach der Art ihrer Aktivierung werden die  $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren in drei Klassen unterteilt (Shingler, 1996). Zur ersten gehören Regulatorproteine von Zwei-Komponenten-Systemen, die durch den oben beschriebenen Phosphatgruppentransfer aktiviert werden. Ein Beispiel hierfür ist NtrB/C, das sehr gut charakterisierte Regulationssystem für die Stickstoff-Assimilation in *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* und *E. coli* (Kustu *et al.*, 1989). Daneben finden sich Regulatoren, deren Aktivität durch Protein-Protein-Interaktion reguliert wird, wie etwa NifA (Dixon, 1998). In die dritte Klasse fallen Transkriptionsaktivatoren, die durch Bindung eines kleinen Moleküls aktiviert werden. Dieses Molekül ist in vielen Fällen das Substrat des von diesen Regulatoren aktivierten Abbauweges. Zu dieser Klasse gehören zum Beispiel XylR (Delgado und Ramos, 1994), DmpR (Shingler und Pavel, 1995) und FhIA, welches noch ausführlich beschrieben werden soll.

Für einige Aktivatoren der dritten Klasse konnte mittels genetischer und biochemischer Ansätze gezeigt werden, daß die Bindung des Effektormoleküls durch die N-terminale Domäne A erfolgt (Delgado und Ramos, 1994; O'Neill *et al.*, 1998; Pavel *et al.*, 1994). Domänenaustausch-Experimente mit XylR und DmpR ergaben, daß eine etwa 80 Basenpaaren entsprechende Sequenz in der N-terminalen Domäne für die Spezifität der Bindung der Effektormoleküle verantwortlich ist (Skärfstad *et al.*, 2000). Die Bindung der Effektormoleküle resultiert in einer Stimulierung der ATPase-Aktivität und somit der Transkriptionsaktivierung durch diese Regulatoren (Shingler und Pavel, 1995). Über Mutationsanalysen konnte eine direkte Interaktion zwischen Domäne A und C nachgewiesen werden (Ng *et al.*, 1996). Um die Domäne A verkürzte Varianten einiger Regulatormoleküle zeigen einen konstitutiv aktiven Phänotyp, das heißt, die Bindung der Effektormoleküle ist für die Aktivität nicht mehr notwendig (Fernández *et al.*, 1995; Shingler und Pavel, 1995). Diese Ergebnisse führten zur Entwicklung eines Arbeitsmodells, in dem die N-terminale Domäne A als intramolekularer Repressor dieser Regulatormoleküle wirken soll (Fernández *et al.*, 1995; Shingler, 1996). In Abwesenheit des Effektors interagiert Domäne A mit dem Rest des Moleküls und blockiert so dessen ansonsten konstitutive Aktivität. Dies könnte zum Beispiel durch eine Maskierung der für die ATP-Hydrolyse verantwortlichen Stellen erfolgen. Nach Bindung des Effektors wird durch Konformationsänderung diese Repression der Domäne A aufgehoben. Für diesen Vorgang ist im Falle von XylR die kovalente Verbindung der Domänen notwendig (Pérez-Martín und de Lorenzo, 1995b).

### 3. Funktion und Regulation der Hydrogenasen von *E. coli*

#### 3.1. Hydrogenase 1 und 2

*E. coli* ist unter anaeroben Bedingungen zur Synthese von mindestens drei, wahrscheinlich vier Hydrogenasen befähigt.

Hydrogenase 1 ist eine nicht-essentielle, membranständige Hydrogenase, die die Oxidation von Wasserstoff katalysiert. Ihre beiden Untereinheiten werden durch Gene des *hya*-Operons (Menon *et al.*, 1990) kodiert. Die Funktion dieser Hydrogenase ist nicht endgültig geklärt, es wird jedoch angenommen, daß sie an der Oxidation von molekularem Wasserstoff und dem Einspeisen der Elektronen in den Quinonpool der Zelle (Sawers *et al.*, 1985) beteiligt ist, was mit einem Energiegewinn verbunden wäre. Eine mögliche physiologische Funktion könnte im Recycling des vom Formiat-Hydrogen-Lyase-Systems während der Gärung produzierten Wasserstoffs (Sawers *et al.*, 1985; Sawers *et al.*, 1986) oder im Elektronentransfer von Formiat zu Fumarat (Francis *et al.*, 1990) liegen.

Die Regulation der Expression und Aktivität der Hydrogenase 1 erfolgt auf sehr komplexe Weise. Die Expression der *hya*-Gene ist unter anaeroben Bedingungen und bei niedrigem pH induziert und wird in Gegenwart von Nitrat stark reprimiert (Brondsted und Atlung, 1994; King und Przybyla, 1999). Mehrere Untersuchungen zeigen, daß die Aktivität der Hydrogenase 1 und die Expression der entsprechenden Gene in Gegenwart von zugegebenem Formiat erhöht sind (Brondsted und Atlung, 1994; King und Przybyla, 1999; Sawers *et al.*, 1985), jedoch werden auch gegenteilige Ergebnisse berichtet (Menon *et al.*, 1991). Ein Zusammenhang mit Streßbedingungen wird aufgrund der Stimulation der Expression der *hya*-Gene bei Phosphat- und Kohlenstoffmangel deutlich und die Beteiligung von RpoS und AppY an der Regulation wurde nachgewiesen (Atlung *et al.*, 1997). Zusätzlich konnte ein Einfluß von NarL und NarP (Richard *et al.*, 1999) und ArcA (Brondsted und Atlung, 1994) auf die Expression der *hya*-Gene gezeigt werden.

Auch Hydrogenase 2 ist wie Hydrogenase 1 ein Wasserstoff oxidierendes Enzym, jedoch ist seine Funktion besser bekannt. Die bei der Wasserstoff-Oxidation entstehenden Elektronen werden zur Fumarat-Reduktase geleitet und reduzieren Fumarat zu Succinat (Ballantine und Boxer, 1986; Sawers *et al.*, 1985). Die Gene, die für die einzelnen Komponenten dieses Enzymes kodieren, sind im *hyb*-Operon lokalisiert (Menon *et al.*, 1994). Das Aktivitätsoptimum der Hydrogenase 2 liegt bei pH 8 (Ballantine und Boxer, 1986) und es konnte gezeigt werden, daß dementsprechend die *hyb*-Gene im Alkalischen stärker exprimiert werden als im sauren Milieu (King und Przybyla, 1999). Die Aktivität des Enzyms ist in Anwesenheit von Fumarat und Wasserstoff (Menon *et al.*, 1994; Sawers *et al.*, 1985) oder Fumarat und Glycerin (Sawers *et al.*, 1985) erhöht. Des weiteren üben FNR (Sawers *et*

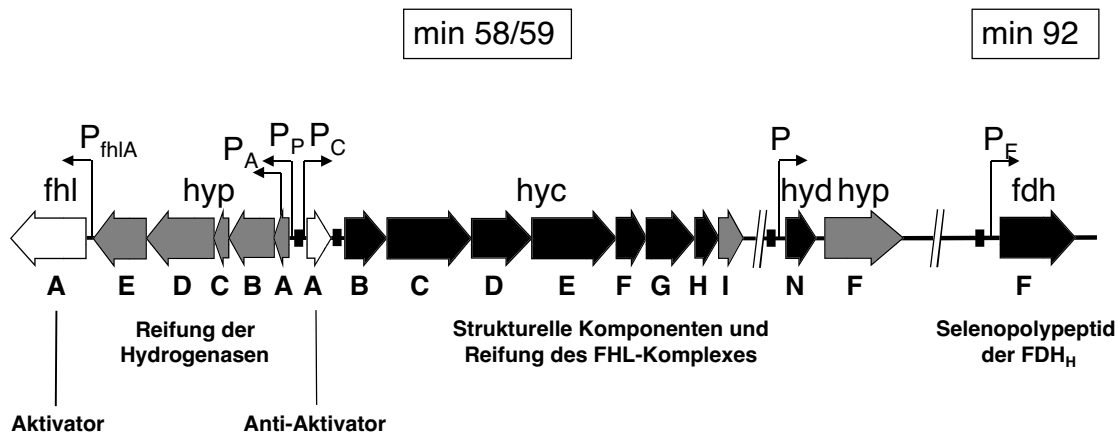


*al.*, 1985) einen positiven, ArcA, NarX/L und NarP/Q (Richard *et al.*, 1999) einen negativen Effekt auf die Expression der *hyb*-Gene aus.

### 3.2. Hydrogenase 3 als Teil des Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplexes von *E. coli*

Hydrogenase 3 unterscheidet sich in Bau und Funktion sehr stark von den Hydrogenasen 1 und 2. Sie ist Teil des Formiat-Hydrogen-Lyase (FHL)-Komplexes von *E. coli* und katalysiert die Bildung von Wasserstoff im Zuge der Oxidation von Formiat während der gemischten Säuregärung. *E. coli* ist ein fakultativ anaerober Organismus, dessen Energiegewinn abhängig von den äußeren Bedingungen durch aerobe Atmung, anaerobe Atmung (wobei Nitrat, Nitrit, Fumarat, Trimethylamin-N-oxid oder Dimethylsulfoxid als Elektronenakzeptoren dienen können) oder Gärung erfolgt. Dabei ist immer die Frage des größtmöglichen Energiegewinns ausschlaggebend bei der Wahl des Stoffwechselweges (Übersicht in Iuchi und Lin, 1993). Unter Bedingungen, unter denen keine Atmung möglich ist, produziert *E. coli* im Zuge der gemischten Säuregärung unter anderem in großen Mengen Formiat. Dieses wird zunächst ausgeschieden, jedoch wieder aufgenommen, wenn der pH-Wert des Mediums zu sehr absinkt (Rossmann *et al.*, 1991; Suppmann und Sawers, 1994), und durch die Aktivität des Selenoproteins Formiatdehydrogenase H (FDH<sub>H</sub>) zu CO<sub>2</sub> oxidiert (Gest, 1954), um der Toxizität entgegenzuwirken. FDH<sub>H</sub> überträgt die Elektronen auf verschiedene Untereinheiten des FHL-Komplexes. Hydrogenase 3 selbst besteht aus einer kleinen und einer großen Untereinheit. Der FHL-Komplex zeigt Ähnlichkeit zur NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase (Übersicht in Finel, 1998; Friedrich und Scheide, 2000), ohne jedoch einer Energiekonservierung zu dienen.

Die Gene für die Komponenten des FHL-Systems sind in vier transkriptionellen Einheiten angeordnet (Abbildung 1). Das für die FDH<sub>H</sub> kodierende Gen *fdhF* ist auf dem Chromosom von *E. coli* bei min 92 lokalisiert (Pecher *et al.*, 1985; Zinoni *et al.*, 1986). Alle weiteren Gene, die in drei Transkriptionseinheiten organisiert sind, kartieren bei min 58/59 des Chromosoms. Die Gene des *hyc*-Operons kodieren vor allem für Untereinheiten der Hydrogenase 3 und für Elektronenüberträger des FHL-Komplexes (Böhm *et al.*, 1990) und das Gen *hycl* für eine an der Reifung der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 beteiligte Protease (Rossmann *et al.*, 1995; Rossmann *et al.*, 1994). Das in divergierender Orientierung zu den *hyc*-Genen liegende *hyp*-Operon kodiert hauptsächlich für Proteine, die für die Ausbildung der Aktivität von Hydrogenase 3 und zum Teil auch für die der Isoenzyme 1 und 2 benötigt werden (Jacobi *et al.*, 1992; Lutz *et al.*, 1991). Das dritte Operon enthält zwei Gene: *hydN* kodiert für eine Komponente des Elektronentransports, *hypF* ist pleiotrop an der Reifung der Hydrogenasen beteiligt (Maier *et al.*, 1996).



**Abbildung 1:** Genetische Organisation des Formiat-Regulons in *E. coli*. Die Gene der vier Transkriptionseinheiten sind durch große Pfeile dargestellt; kleine Pfeile repräsentieren Promotoren, wobei  $P$ ,  $P_P$ ,  $P_C$  und  $P_E$  die  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren bezeichnen,  $P_A$  den FNR-abhängigen Promotor und  $P_{fhlA}$  den  $\sigma^{70}$ -abhängigen Promotor. Kleine schwarze Vierecke stellen die UAS dar. Gene, die für strukturelle Komponenten des FHL-Komplexes kodieren, sind in schwarz dargestellt, Gene für akzessorische Proteine in grau und Gene mit regulatorischer Funktion in weiß. Abbildung verändert nach Leonhartsberger *et al.* (2001b).

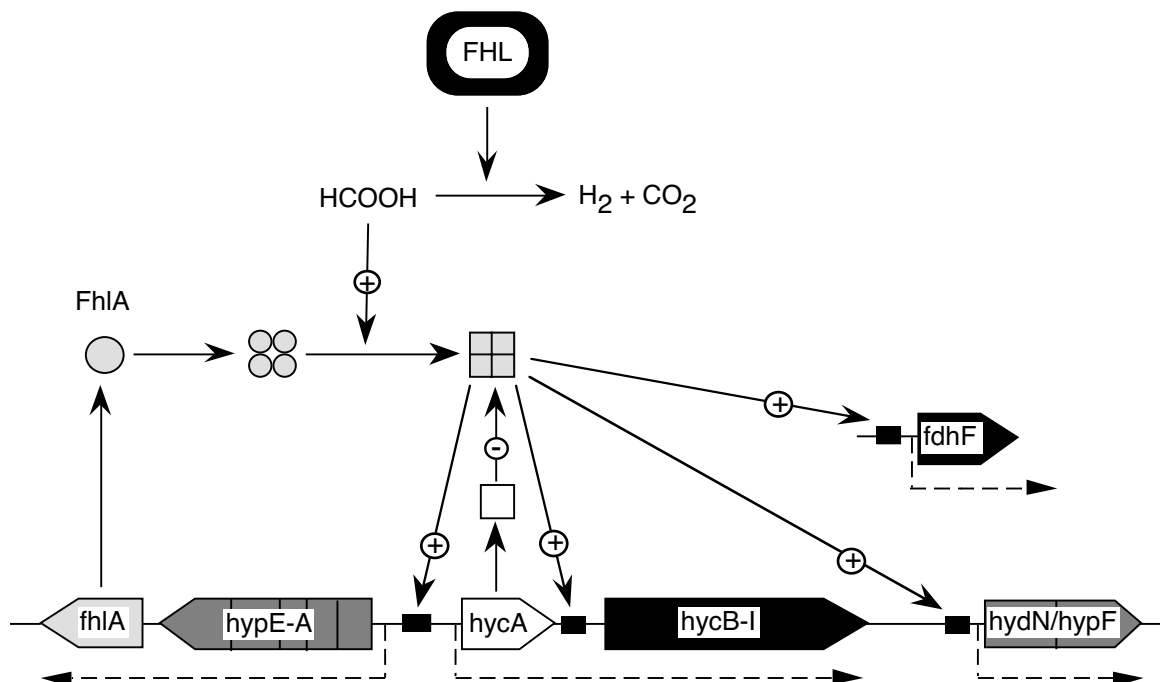
Die Bildung des FHL-Komplexes wird nur unter anaeroben Bedingungen induziert, wobei Nitrat einen reprimierenden, Formiat, Molybdat und ein niedriger pH-Wert des Mediums jedoch einen stimulierenden Effekt auf die Synthese haben (Lutz *et al.*, 1990; Pecher *et al.*, 1983). Die Molybdataabhängigkeit der Expression der für die Hydrogenase 3 kodierenden Gene scheint durch verschiedene Systeme vermittelt zu sein. Zunächst ist ModE für die optimale Expression des *hyc*-Operons in Anwesenheit von Formiat notwendig (Self *et al.*, 1999). Darüberhinaus ist auch MoeA an der Aktivierung dieser Gene beteiligt (Hasona *et al.*, 1998) und es wurde postuliert, daß MoeA die Produktion einer aktivierten Form von Molybdat katalysiert, welche ihrerseits mit dem Transkriptionsaktivator FhIA interagieren könnte (Self und Shanmugam, 2000).

Es konnte gezeigt werden, daß der Effekt von Nitrat, Formiat und Sauerstoff durch ein einziges Signal vermittelt wird, nämlich die intrazelluläre Formiat-Konzentration (Rossmann *et al.*, 1991). Diese wird durch die Aktivität der Pyruvat-Formiat-Lyase, der Formiatdehydrogenase N und des Formiattransportsystems beeinflusst (Berg und Stewart, 1990; Knappe und Sawers, 1990; Rossmann *et al.*, 1991; Übersicht in Leonhartsberger *et*

*al.*, 2001b). Aufgrund der zentralen Rolle von Formiat in der Regulation des FHL-Komplexes bezeichnet man die dazugehörigen Transkriptionseinheiten auch als Formiat-Regulon.

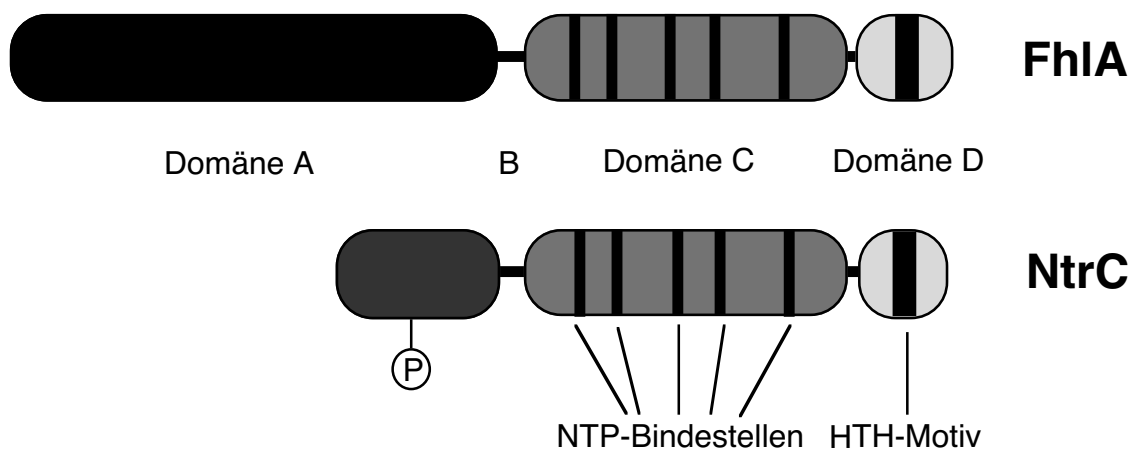
Im Zusammenhang mit der Regulation der für die Hydrogenase 3 kodierenden Gene wurde ein Operon beschrieben, welches zwei Gene enthält. *hydH* zeigt Ähnlichkeit zu Sensorkinasen von Zwei-Komponenten-Systemen und *hydG* weist einen hohen Grad an Ähnlichkeit zu Regulatorproteinen auf (Stoker *et al.*, 1989). Genauere Untersuchungen zur Funktion dieser Gene stehen jedoch noch aus.

Wie sich herausstellte, erfolgt die Regulation des FHL-Systems auf der Ebene der Transkription. Für alle vier Transkriptionseinheiten des Formiat-Regulons konnten  $\sigma^{54}$ -abhängige Promotoren identifiziert werden (Birkmann und Böck, 1989; Lutz *et al.*, 1990; Maier *et al.*, 1996; Abbildung 1). Für ihre Aktivierung ist  $E\sigma^{54}$  im Zusammenspiel mit einem Transkriptionsfaktor verantwortlich, welcher von *fhIA*, dem promotordistalen Gen des *hyp*-Operons, kodiert wird (Sankar *et al.*, 1988; Schlenzog und Böck, 1990; Abbildung 2). Zusätzlich konnte auch ein schwacher  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotor vor *fhIA* gefunden werden, der sicherstellt, daß zu jedem Zeitpunkt eine geringe Menge dieses Aktivators in der Zelle vorhanden ist. Die für pleiotrope Funktionen verantwortlichen Gene des *hyp*-Operons werden außerdem von einem FNR-abhängigen Promotor transkribiert, der innerhalb von *hypA* liegt (Lutz *et al.*, 1991).



**Abbildung 2:** Regulation der  $\sigma^{54}$ -abhängigen Expression der Gene des Formiat-Regulons durch FhIA. Für Erklärungen siehe Text.

Der Transkriptionsaktivator FhIA ist ein 78,5 kDa großes Protein, welches als Tetramer gereinigt werden konnte (Schlensog *et al.*, 1994). Er weist in der zentralen und C-terminalen Domäne Sequenzähnlichkeit zu anderen  $\sigma^{54}$ -abhängigen Regulatoren auf (Abbildung 3). Die N-terminale Domäne ist jedoch mit etwa 400 Aminosäuren außergewöhnlich lang und zeigt keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen, mit Ausnahme von HyfR (siehe unten). Am C-Terminus des Proteins findet sich ein Helix-Turn-Helix-Motiv und tatsächlich konnte für das gereinigte Protein DNA-Bindung nachgewiesen werden (Schlensog *et al.*, 1994). Die Bindestellen für FhIA befinden sich in den für UAS üblichen Entfernungen vor den jeweiligen Promotoren (Maier *et al.*, 1996; Schlensog *et al.*, 1994). Ihre Konsensussequenz konnte durch Hydroxyradikal-Footprinting-Analysen als 5'-CATTTCGT-ACGAAATG-3' bestimmt werden (Leonhartsberger *et al.*, 2000). Die zentrale Domäne von FhIA weist Nukleotid-Bindestellen auf und für das gereinigte Protein konnte ATP- und GTP-Hydrolyse nachgewiesen werden, welche durch die Zugabe von Formiat und DNA beträchtlich gesteigert wird (Hopper und Böck, 1995). Das weist auf eine direkte Bindung des Effektormoleküls Formiat an FhIA hin, was in *in vitro*-Transkriptionsversuchen bestätigt werden konnte (Hopper *et al.*, 1996). Demzufolge ist FhIA nach Art seiner Aktivierung in die dritte Gruppe der  $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren einzuordnen.



**Abbildung 3:** Domänenstruktur von FhIA und Ähnlichkeiten zu NtrC. Die Phosphorylierungsstelle, die NTP-Bindestellen und das Helix-Turn-Helix (HTH)-Motiv von NtrC sind markiert (Rombel *et al.*, 1999). Bereiche von FhIA, die Ähnlichkeiten zu NtrC aufweisen, sind entsprechend dargestellt.

Neben FhIA ist mit HycA ein weiteres Protein, das im Formiat-Regulon kodiert ist, in die Regulation dieser Transkriptionseinheiten involviert. Dabei ist die Wirkung von HycA antagonistisch zu FhIA. Eine Überexpression des Gens führt zu einer verringerten Aktivität von FhIA, während eine Deletion von *hycA* die Aktivität steigert (Hopper, 1995; Sauter *et al.*, 1992). Der Wirkungsmechanismus von HycA ist noch nicht geklärt. Das Protein hat keine

DNA-Bindesequenzen und eine DNA-Bindung konnte dementsprechend für das gereinigte Protein auch nicht nachgewiesen werden (Böhm *et al.*, 1990; Hopper, 1990). Einige Ergebnisse sprechen für eine direkte Interaktion von HycA mit FhIA (Korsa, 1998), jedoch kann auch eine Beeinflussung der intrazellulären Formiatkonzentration zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden.

Die Regulation des FHL-Systems erfolgt nicht nur durch Proteine. Kürzlich wurde OxyS, ein 109 Nukleotide langes, nicht-translatiertes RNA-Molekül gefunden, dessen Synthese unter Bedingungen von oxidativem Streß induziert wird und die Regulation verschiedener Gene (Altuvia *et al.*, 1998) bewirkt. Auch das Formiat-Regulon ist davon betroffen, denn OxyS bildet mit der Ribosomenbindestelle der *fhIA*-mRNA und einem kurzen Bereich der kodierenden Sequenz von *fhIA* doppelsträngige Bereiche aus, was die Translation von FhIA verhindert (Argaman und Altuvia, 2000). Dies stellt einen weiteren Kontrollprozeß dar, der die Bildung des FHL-Komplexes unter aeroben Bedingungen verhindert.

Vor einigen Jahren wurde ein weiteres Operon (*hyf*) identifiziert, das Gene enthält, die hohe Sequenzähnlichkeit zu Komponenten anderer Hydrogenasen, vor allem zu Hydrogenase 3 zeigen (Andrews *et al.*, 1997). Eine Charakterisierung dieser Hydrogenase 4 erfolgte bislang jedoch nur auf genetischer Ebene. Da im Vergleich zu Hydrogenase 3 drei weitere membranständige Untereinheiten gefunden wurden, wird postuliert, daß es sich bei Hydrogenase 4 ebenfalls um eine Formiat-Hydrogen-Lyase handelt, die aber im Gegensatz zum bisher bekannten FHL-System die Translokation von Protonen bewirken und damit zur Energiegewinnung beitragen könnte. Das Operon enthält das Gen eines potentiellen Regulators HyfR, der 46 % Identität zu FhIA zeigt (69 % in der zentralen und C-terminalen Domäne) (Andrews *et al.*, 1997) und als Regulator für das *hyf*-Operon in Frage kommt. Ebenfalls diskutiert wurde die Beteiligung von HyfR an der FhIA-unabhängigen Formiat-Induktion des *cyx-appA* Operons und des *appY*-Gens (Brondsted und Atlung, 1996).

#### 4. Ziel dieser Arbeit

Um den komplexen Wirkungsmechanismus von FhIA mit der Vielzahl seiner ineinandergreifenden und regulierten Aktivitäten genauer zu verstehen, erschien die Untersuchung der Eigenschaften der einzelnen Domänen ein geeigneter Ansatz. In der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit wurde die N-terminale Domäne von FhIA als separates Protein FhIA-N gereinigt und analysiert. Dabei stellte sich heraus, daß FhIA-N selbst weder transkriptionsaktivierende noch ATP-hydrolysierende Eigenschaften besitzt, jedoch die Aktivität von FhIA hemmt (Leonhartsberger, 1997; Leonhartsberger *et al.*, 2000). Diese Versuche sollten nun mit der Analyse des restlichen Teils von FhIA und des

Zusammenspiels der Domänen fortgeführt werden und die Struktur-Funktionsbeziehungen von FhIA weiter aufklären. Ein zweites Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der phylogenetischen Verbreitung des FhIA-Regulationssystems und im Vergleich von Struktur und Funktion von FhIA-Orthologen aus verschiedenen Spezies. Im Laufe dieser Arbeit ergab sich darüberhinaus die interessante Frage, inwieweit das Zwei-Komponenten-System HydH/G in die Regulation des FHL-Regulons involviert ist und welche physiologische Funktion diesem Regulationssystem zukommt.

## MATERIAL UND METHODEN

### 1. Mikrobiologische Methoden

#### 1.1. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 1 und 2 aufgeführt.

**Tabelle 1:** Verwendete *E.coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>hsdS gal</i> λDE3	Studier und Moffatt (1986)
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD139 Δ(argF-lac)U196 ptsF25 deoC1 relA1 flbB5301 rpsL150 λ<sup>-</sup></i>	Casadaban und Cohen (1979)
SA2	MC4100, <i>ΔfhlA</i>	Schlenzog (1993)
SA22	SA2 <i>hycA<sup>-</sup>-lacZ</i>	Hopper (1995)
EM66 (SM6009)	<i>aceA1zja::Tn10</i>	Maloy <i>et al.</i> (1980)
MC4100ΔG	MC4100, <i>ΔhydG</i>	diese Arbeit
MC4100ΔH	MC4100, <i>ΔhydH</i>	diese Arbeit
MC4102	MC4100, <i>hycA<sup>-</sup>-lacZ</i>	Hopper <i>et al.</i> (1994)
MC4102ΔG	MC4102, <i>ΔhydG</i>	diese Arbeit
MC4102ΔH	MC4102, <i>ΔhydH</i>	diese Arbeit
SA22ΔH	SA22, <i>ΔhydH</i>	diese Arbeit
MCzra	MC4100, <i>zraP<sup>-</sup>-lacZ</i>	diese Arbeit
MCΔGzra	MC4100ΔG, <i>zraP<sup>-</sup>-lacZ</i>	diese Arbeit
MCΔHzra	MC4100ΔH, <i>zraP<sup>-</sup>-lacZ</i>	diese Arbeit
BN450	MC4100, <i>ntrA208::Tn10</i>	Birkmann <i>et al.</i> (1987a)
BN450zra	BN450, <i>zraP<sup>-</sup>-lacZ</i>	diese Arbeit
HD705	MC4100, <i>ΔhycE</i>	Sauter <i>et al.</i> (1992)

**Tabelle 2:** Verwendete Mikroorganismen anderer Gattungen.

Organismus	Genotyp	Referenz
<i>Salmonella typhimurium</i> TL117	del ( <i>proAB</i> )47	Csonka (1981)
<i>Citrobacter freundii</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Wildtyp	Laborsammlung
<i>Proteus mirabilis</i> 30115	Wildtyp	DSMZ
<i>Proteus vulgaris</i> 2140	Wildtyp	DSMZ
<i>Klebsiella terrigena</i> 2687	Wildtyp	DSMZ
<i>Klebsiella oxytoca</i> M5a1	Wildtyp	Bender (1977)
<i>Serratia marcescens</i> 30121	Wildtyp	DSMZ

---

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

## 1.2. Anzucht von Bakterien

Die aerobe Anzucht von Bakterien erfolgte in Erlenmeyer-Kolben, die zu einem Zehntel Volumen mit Medium gefüllt waren, soweit nicht anders angegeben bei 37 °C. Für anaerobe Anzuchten wurden die Bakterien in mit Stickstoff begasten Serumflaschen inkubiert (Balch und Wolfe, 1976). Als Vollmedien wurde LB-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl) (Miller, 1992) oder TGYEP-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,4 % Glucose, 100 mM Kalium-Phosphat pH 6,5, falls nicht anders angegeben) (Begg *et al.*, 1977) verwendet. In einigen Fällen wurde LB-Medium, das mit 0,4 % Glucose und 100 mM K-Morpholinopropansulfonat (MOPS, pH 6,5 mit KOH eingestellt) supplementiert wurde, eingesetzt. Als Minimalmedium kam, soweit nicht anders angegeben, Werkmann-Minimalmedium (Fraenkel und Neidhardt, 1961) zur Anwendung.

Zellen, die für die Auftrennung durch zweidimensionale Gelelektrophorese markiert wurden, wurden in MOPS-Medium (Neidhardt *et al.*, 1974) kultiviert, das mit 0,5 % Glucose, Aminosäuremix (alle 18 Standardaminoacids außer Cystein und Methionin, jeweils 50 µg/ml) und 1 mM ZnCl<sub>2</sub> supplementiert war.

Die Selektion von Klonen, die eine funktionelle β-Galaktosidase bilden, erfolgte auf MacConkey-Agar (GibcoBRL, Eggenstein) oder auf LB-Platten mit 40 µg/ml X-Gal.

Supplemente und Antibiotika wurden auf folgende Endkonzentrationen zugesetzt: NiCl<sub>2</sub> 5 µM, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 1 µM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 µM, Natriumformiat 30 mM, Kanamycinsulfat 50 µg/ml, Chloramphenicol 30 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml, Tetracyclin 15 µg/ml.



Das Wachstum wurde über die Zunahme der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) verfolgt.

### 1.3. Physiologischer Test auf Gasbildung

Das bei der Gärung entstehende Gas, im Fall von *E. coli* das durch den Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplex gebildete  $H_2$  und  $CO_2$ , wurde in diesem Test semi-quantitativ nachgewiesen. Die Zellen wurden in 10 ml Gastest-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 0,8 % Glucose) in Reagenzgläsern stehend bei 37 °C angezogen. Das entweichende Gas wurde dabei in umgedrehten Durham-Röhrchen im Medium aufgefangen. Die Auswertung erfolgte nach Einstellung des Wachstums.

### 1.4. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) verschiedener *E. coli*-Stämme für  $ZnCl_2$  wurde in LB-Medium unter aeroben Bedingungen bei 37 °C bestimmt. Hierzu wurden Reagenzgläser mit je 1,5 ml Medium, das verschiedene Konzentrationen an  $ZnCl_2$  (10; 5; 2,5; 1,25 bzw. 0,625 mM) enthielt, mit Vorkulturen der Zellen in einer  $OD_{600}$  von 0,01 beimpft und nach jeweils 24 und 36 h auf Wachstum untersucht.

## 2. Molekularbiologische Methoden

### 2.1. Oligonukleotide

Tabelle 3 enthält eine Liste der verwendeten Oligonukleotide. Oligonukleotide, die zum Sequenzieren verwendet wurden und eine Teilsequenz der entsprechenden Gene darstellen, sind nicht aufgeführt.

**Tabelle 3:** Verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen sind fett gedruckt.

Bezeichnung	Zielort	Sequenz (5'-3')
<b>FhIA</b>		
SLCN2	<i>fhIA</i> -C 5'-Ende	CGATAGCC <b>CATAT</b> GGGCGAGATTATTGGCCGC
SLCC	<i>fhIA</i> -C 3'-Ende	GGC <b>GAATTCC</b> AGTTAAATCAATGCCG
IK15	<i>fhIA</i> -C 5'-Ende	CATTTTGTTCCTCCAGGAAAGC
SL12	<i>fhIA</i> -C 3'-Ende	GGCGAGATTATTGGCCGC

FhIAEaKo-N	<i>fhlA<sub>Ko</sub></i> und <i>fhlA<sub>Ea</sub></i> 5'- Ende	TGGACTTAAC <b>CATATG</b> TCGTATACACC
FHLAEa-C	<i>fhlA<sub>Ea</sub></i> 3'-Ende	GAGACATATC <b>GGATCC</b> CTAGACTAACCG
FHLAKo-C	<i>fhlA<sub>Ko</sub></i> 3'-Ende	CGTTCTGAAG <b>GGATCC</b> CTACTGCAGCTG

### HydH/G

HydH-N	<i>hydH</i> 5'-Ende	CAAAGAAG <b>CATATG</b> CGTTTTATGCAAC
HydH-C	<i>hydH</i> 3'-Ende	TTAT <b>GAATTC</b> CATCCTTGTGGGTCC
HydG-N	<i>hydG</i> 5'-Ende	GGACCCACAC <b>CATATG</b> ACGCACGATAAT
HydG-C	<i>hydG</i> 3'-Ende	CGA <b>GAATTC</b> CTAACGCGACAGTTTTGC
HydHup1	5'-Region von <i>hydH</i>	CAGGGCAATTTTCGTGTTCC
HydHup2	5'-Region von <i>hydH</i>	CCTGCGCTGTAACACAAGG
HydHup3	5'-Region von <i>hydH</i>	GGTATTGCATCTTCCGTGCC
HydHup4	5'-Region von <i>hydH</i>	GGCACGGAAGATGCAATACC
HydHup6	5'-Region von <i>hydH</i>	CAGGCGAGTCATTTTTACTC
HydH5	<i>hydH<sub>Ko</sub></i>	AGCGCCACCAGCTTTTTCTTTT
HydHA1	5'-Region von <i>hydH</i>	GATGGCATGATTTCTGCTGTC
HydH8	<i>hydH<sub>Ko</sub></i>	GCGAAACTGACGATAAATCTCCAGCGC
HupA	<i>hupA</i> 5'-Ende	ATGAACAAGACTCAACTGATTGATGTAA
FootA	5'-Region von <i>hydH</i>	GGT <b>GGATCC</b> TCCAGTGGTTGTCTTAC
FootB	5'-Region von <i>hydH</i>	CCTGC <b>GGATCC</b> CTTTCTGACAGCAG

### ZraP

laczra1	<i>zraP</i> 5'-Ende	CG <b>GGATCC</b> ATTTTCGTGTTCCGTTTCATG
laczra2	5'-Region von <i>zraP</i>	GCAG <b>GAATTC</b> ATGCCATCTTTTATC

### allgemein

uni	pUC19/pSU2719	GTAAAACGACGGCCAGT
rev	pUC19/pSU2719	CAGGAAACAGCTATGAC

---

## 2.2. Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten und konstruierten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4:** Verwendete Plasmide.

Plasmid	Genotyp	Referenz
<b>Vektoren</b>		
pT7-7	Ap <sup>R</sup> , T7Φ10	Tabor und Richardson (1985)
pBR322	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Bolivar <i>et al.</i> (1977)
pSU2719	Cm <sup>R</sup> ; <i>lacZα</i>	Martinez <i>et al.</i> (1988)
pMAK700	Cm <sup>R</sup>	Hamilton <i>et al.</i> (1989)
pRS552	Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , ' <i>lacZ lacY<sup>+</sup> lacA</i>	Simons <i>et al.</i> (1987)
<b>Genbank</b>		
<i>K. oxytoca</i> M5a1 Genbank	pSU2719, 5-20 kb große <i>Sau3A</i> - Fragmente chromosomaler DNA aus <i>K.</i> <i>oxytoca</i> M5a1	Fiedler <i>et al.</i> (1996)
<b>FhIA</b>		
pSH17	pBR322, <i>hycA</i>	Hopper und Böck (1995)
pSH91	pACYC184, <i>fhIA</i>	Korsa und Böck (1997)
pDL8-1	<i>srl, invA, hilH, fhIA<sub>St</sub></i>	Mills <i>et al.</i> (1995)
pBN205	<i>fdhF'-lacZ</i>	Birkmann <i>et al.</i> (1987b)
pFHLAC-3	pT7-7, <i>fhIA</i> -C (Nukleotide 1135 bis 2076 von <i>fhIA</i> )	diese Arbeit
pFHLAC-4	pSH91, <i>fhIA</i> -C	diese Arbeit
pKOFHLA	pSU2719, <i>fhIA<sub>Ko</sub></i>	diese Arbeit
pEAFHLA	pSU2719, <i>fhIA<sub>Ea</sub></i>	diese Arbeit
pTKOFA	pT7-7, <i>fhIA<sub>Ko</sub></i>	diese Arbeit
pTEAFA	pT7-7, <i>fhIA<sub>Ea</sub></i>	diese Arbeit
<b>HydH/G</b>		
pSKOG	pSU2719, ' <i>hydH-hydG<sub>Ko</sub></i>	diese Arbeit

pSECG	pSU2719, <i>hydH-hydG</i>	diese Arbeit
pHYDG	pT7-7, <i>hydG</i>	diese Arbeit
pHYDH	pT7-7, <i>hydH</i>	diese Arbeit
pHYDHG	pT7-7, <i>hydHG</i>	diese Arbeit
pHYDΔH	pHYDH, <i>hydH</i> (Δ568 bis 979)	diese Arbeit
pHYDΔG	pHYDG, <i>hydG</i> (Δ359 bis 985)	diese Arbeit
pMAKΔH	pMAK700, <i>hydH</i> (Δ568 bis 979)	diese Arbeit
pMAKΔG	pMAK700, <i>hydG</i> (Δ359 bis 985)	diese Arbeit
pUHupA	pUC19, 226 bp der <i>zraP-hydH</i> -intergenen Region in Orientierung A	diese Arbeit
pUHupB	pUC19, 226 bp der <i>zraP-hydH</i> -intergenen Region in Orientierung B	diese Arbeit
<b>ZraP</b>		
pRzra	pRS552, <i>zraP</i> '-` <i>lacZ</i>	diese Arbeit

---

### 2.3. Standardmethoden zur Analyse und Modifikation von DNA

Molekularbiologische Standardmethoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach Sambrook *et al.* (1989), Miller (1992) und Ausubel *et al.* (1997) durchgeführt. Darunter fielen die Auftrennung von DNA in Agarosegelen, enzymatische Reaktionen an DNA, radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten, Transformationen, P1- und  $\lambda$ -Phagen-Transduktion. Standardpuffer wie TE, TAE und TBE wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland). Die Präparation von bakterieller Gesamt-DNA erfolgte nach der CTAB-Methode (Murray und Thompson, 1980), die Präparation von Plasmid- und Cosmid-DNA nach Holmes und Quigley (1981) oder mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kits von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland). Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten, durch Ausschleudern über 100 %-Viskose-Watte von der Agarose getrennt und anschließend gereinigt.

Die Sequenzierung von DNA erfolgte unter Verwendung des Dye Terminator Cycle Sequencing Kit mit der AmpliTaq DNA Polymerase FS. Die Daten wurden mit einem ABI Prism 377 Sequencer (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Warrington, Großbritannien) gesammelt.

## 2.4. Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA mittels PCR erfolgte in einem Personal Cycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) prinzipiell nach den Angaben von Pajatsch (1999), wobei die Temperaturen und Zeiten der einzelnen Programmschritte den jeweiligen Erfordernissen angepaßt wurden. Normalerweise wurde Taq Polymerase (in der Arbeitsgruppe gereinigt) verwendet, für die Amplifikation zu klonierender DNA jedoch Pfu Polymerase (Promega; Mannheim) wegen ihrer geringeren Fehlerrate. Für die Synthese längerer PCR-Produkte, zum Beispiel beim Einführen von Punktmutationen durch inverse PCR, wurde das Expand High Fidelity PCR System von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Als DNA-Matrize diente gereinigte DNA oder durch Kochen lysierte Zellen.

## 2.5. DNA/DNA-Hybridisierung (Southern Blot)

Für den Nachweis von orthologen *fhIA*-Genen in verschiedenen Mikroorganismen wurden jeweils 5 µg genomische DNA mit diversen Restriktionsenzymen vollständig geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Danach wurde die DNA nach der Methode von Southern (1975) denaturiert, in einem Kapillarblot (Sambrook *et al.*, 1989) auf eine Nylonmembran transferiert und durch Bestrahlung mit UV-Licht fixiert. Die Detektion der spezifischen DNA-Fragmente erfolgte mittels des Chemiluminescence-Systems von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland). Als Sonden dienten mit dem "random prime labelling and detection system" (Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) markierte PCR-Fragmente, die die Nukleotide 13-726 bzw. 227 bis 1044 von *fhIA* aus *E. coli* umfaßten.

## 3. Biochemische Methoden

### 3.1. Standardmethoden zur Analyse von Proteinen

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen in Lösung erfolgte nach der Methode von Whitaker und Granum (1980) oder, für gereinigte Proteine, über die spezifische Absorption bei 280 nm. Denaturierende Gelelektrophorese wurde durchgeführt nach der Methode von Laemmli (1970), falls nicht anders angegeben in 10 %igen Gelen. Die Proteine wurden hierzu in SDS-Probenpuffer (80 mM Tris/Cl pH 6,8, 100 mM DTT, 2 % SDS, 10 % Glycerin, Bromphenolblau) vorbereitet. Zur Analyse von Ganzzellextrakten wurden sogenannte SDS-Lysate hergestellt, indem Zellen aus 1 ml einer Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1 in 100 µl SDS-Probenpuffer durch 3-minütiges Kochen lysiert wurden. Davon wurden 10 µl

pro Spur aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Coomassie- oder Silberfärbung (Blum *et al.* (1987) sichtbar gemacht, wobei in der Silberfärbung Methanol durch Ethanol ersetzt wurde.

### **3.2. Bestimmung der relativen Molekülmasse durch Gelfiltration**

Die relative Molekülmasse von gereinigten Proteinen wurde über ihr Elutionsverhalten auf Gelfiltrationssäulen bestimmt. Die nativen Proteine wurden dazu auf den entsprechenden Säulen chromatographiert und ihr Laufverhalten wurde mit dem von Proteinen bekannter Größe verglichen.

Für die Bestimmung der Molekülmasse von FhIA-C wurde das Protein auf eine Superdex 75 (16/60)-Säule aufgetragen, die mit Puffer A (siehe 3.4.2.), der 100 mM KCl enthielt, mit einer Flußrate von 0,5 ml/min gespült wurde.

### **3.3. Markierung von Zellextrakten und Auftrennung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese**

Zellen wurden in supplementiertem MOPS-Medium aerob angezogen und in der logarithmischen Phase markiert. Dazu wurden jeweils Zellen aus 1 ml einer Kultur der OD<sub>600</sub> 0,5 über einen Zeitraum von 4 min mit 5-10 µCi Tran<sup>35</sup>S-Label (70 % Methionin, 30 % Cystein; 10,5 µCi/µl, 1175 Ci/mmol; ICN Biomedicals, Irvine, California, USA) inkubiert. Danach wurden 10 µl 100 mM nicht-radioaktives Methionin zugegeben und die Proteinsynthese wurde nach weiteren 90 s durch Transfer der Zellen auf Eis gestoppt. Um nicht-inkorporierte Aminosäuren und Lipide, die bei der Elektrophorese stören, von den Proteinen abzutrennen, wurden die Zellen danach zweimal mit eiskaltem 80 % Aceton gewaschen und schließlich getrocknet und bei -30 °C gelagert. Die Zellen wurden durch Suspendieren in 120 µl Lyselösung (9 M Harnstoff, 2 % Triton X-100, 130 mM DTT, 20 µl/ml Servalyte 3-10 Iso-Dalt, 8 mM PMSF) und 6-8 stündige Inkubation bei Raumtemperatur aufgebrochen. Die gelösten Proteine wurden durch zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die 2D-Gelelektrophorese wurde nach den von O'Farrell (1975) vorgestellten Grundprinzipien durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt an einer Multiphor II Elektrophoreseeinheit (Pharmacia) in Verbindung mit dem "Immobiline Dry Strip Kit" (Pharmacia), wobei im wesentlichen die Angaben des Herstellers und einige von Görg *et al.* (1995) erarbeitete Verbesserungen Beachtung fanden. 180 mm lange Immobiline Dry Strips (pH 3-10, nicht-linearer Gradient oder pH 4-7, linearer Gradient; Pharmacia) wurden über Nacht in Rehydrierungslösung (8 M Harnstoff, 0,5 %

Triton X-100, 5,2 µl/ml Servalyte 3-10, 13 mM DTT) gequollen und in der Elektrophoreseeinheit mit einer EPS 3500 Hochspannungsquelle (Pharmacia) 30 min bei 150 V vorfokussiert. Danach wurde die Probe an der kathodischen (sauren) Seite appliziert und bei 500 V 1 h elektrophoriert, bevor die eigentliche isoelektrische Fokussierung in einem steigenden Gradienten bis 3500 V (1 mA, 1 W) über etwa 16 h erfolgte, bis 55 - 60 kWh erreicht waren. Während des gesamten Laufs wurde die Anlage mit einem Kryostaten auf 18 °C temperiert.

Danach wurden die Streifen an beiden Enden leicht gekürzt und je 20 min in Lösung 1 (6 M Harnstoff, 50 mM Tris/Cl pH 6,8, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 10 mg/ml DTT) und Lösung 2 (wie 1, nur statt DTT 45 mg/ml Iodoacetamid) äquilibriert. Die Auftrennung nach der Größe erfolgte in 18 x 18 cm großen vertikalen SDS-Polyacrylamidgelen (12,5 % oder 15 %) nach Laemmli (1970), wobei kein Sammelgel verwendet wurde, sondern die Streifen direkt auf das Trenngel gelegt und mit 1 % Agarose und 0,0002 % Bromphenolblau in SDS-Laufpuffer fixiert wurden. Es wurde etwa 4 h bei 30 mA bei Raumtemperatur elektrophoriert. Anschließend wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen und schließlich nach längerem Waschen in 5 % Glycerin, 10 % Ethanol ein bis zwei Tage zwischen Zellophan getrocknet und mehrere Tage auf einem Phosphorscreen exponiert.

### 3.4. Reinigung von Proteinen

Die Reinigungen von Proteinen wurden bei 4 °C an einer FPLC-Anlage von Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) mit Säulen oder Säulenmaterialien von Pharmacia durchgeführt.

#### 3.4.1. Reinigung von FhIA

FhIA wurde gereinigt wie beschrieben (Schlensog *et al.*, 1994).

#### 3.4.2. Reinigung von FhIA-C

Die Anzucht von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die frisch mit dem Plasmid pFHLAC-3 transformiert worden waren, erfolgte unter aeroben Bedingungen in 5 l -Erlenmeyerkolben mit Schikanen, die mit jeweils 2 l LB-Medium gefüllt waren. Da die Löslichkeit des überproduzierten Proteins bei 30 °C besser war als bei höheren Temperaturen, wurde diese Temperatur für die Anzucht gewählt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde mit 0,05 mM IPTG die Expression induziert. Nach 3 h wurden die Zellen durch Abzentrifugieren in einer Milchzentrifuge geerntet, in 50 mM Tris/Cl pH 7,5, 1 mM DTT resuspendiert und nochmals

abzentrifugiert. Danach wurde das Sediment in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Der Aufbruch der Zellen erfolgte nach Suspendieren im doppelten Zellvolumen Puffer A (50 mM Tris/Cl pH 7,5, 2 mM EDTA pH 8, 1 mM DTT), dem 1 mM PMSF beigelegt war, durch drei Passagen durch eine French Press-Zelle bei 130 MPa. Das erhaltene Zellysat wurde durch dreißigminütiges Zentrifugieren bei 30000 g von unlöslichen Bestandteilen befreit, Membranen wurden durch Zentrifugation bei 100000 g für 2 h abgetrennt. Der Überstand wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen. Die bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration zwischen 30 % und 40 % Sättigung ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation gesammelt, in Puffer A gelöst und über Nacht gegen Puffer A dialysiert. Die nach der Dialyse unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt, bevor die Proteinlösung auf eine mit Puffer A äquilibrierte Mono Q HR 5/5- Säule aufgetragen wurde. Die Proteine wurden mit einem aufsteigenden linearen Gradienten von 0 bis 1 M KCl in Puffer A aufgetrennt. Die saubersten FhIA-C enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, gegen Puffer A mit 50 % Glycerin dialysiert und bei -20 °C gelagert.

### **3.4.3. Reinigung von HydG**

Bei der Reinigung von HydG wurde nach dem von A. Huber erarbeiteten Protokoll (Huber, 1999) vorgegangen, das jedoch modifiziert wurde. Die nach der Ammoniumsulfat-Fällung erhaltene Proteinlösung wurde nach der Dialyse gegen Puffer B (50 mM Tris/Cl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) an einer Q-Sepharose-Anionenaustauschersäule (8 ml Volumen) mit einem 100 ml-Gradienten von 0 bis 400 mM NaCl in Puffer B chromatographiert. HydG eluierte bei einer NaCl-Konzentration von ungefähr 200 mM. Geeignete Fraktionen wurden vereinigt, gegen Puffer C (100 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % Glycerin) dialysiert und bei -20 °C gelagert.

## **3.5. Bestimmung von Enzymaktivitäten**

### **3.5.1. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität**

Die entsprechenden Bakterienstämme wurden in LB- oder TGYEP-Medium anaerob oder aerob bei 37 °C kultiviert, bis die Kulturen eine OD<sub>600</sub> von ungefähr 0,5 erreichten. Danach wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach der Methode von Miller (1992) bestimmt.



### 3.5.2. Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die ATP-Hydrolyse-Aktivität von FhIA-C wurde bestimmt wie in Hopper und Böck (1995) beschrieben. Gereinigtes FhIA-C und FhIA lagen im Test in einer Konzentration von 470 nM vor (berechnet für das Monomer), FhIA-N in einer Konzentration von 4700 nM. Einige Ansätze enthielten 10 mM Kaliumformiat oder 1  $\mu$ M DNA. Dabei wurden zwei verschiedene doppelsträngige DNA-Fragmente verwendet, die durch Hybridisieren von Oligonukleotiden erhalten wurden. SL1-2 enthielt einen Bereich aus der intergenen Region zwischen *hycA* und *hypA*, der durch DNase I Footprint-Analysen als Bindestelle für FhIA identifiziert worden war. SH8-9 dagegen diente als unspezifisches DNA-Fragment; es enthält einen Bereich aus der 5'-Region von *fdhF*, der keine Bindestelle für FhIA aufweist. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Hopper und Böck (1995) aufgeführt. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 30 min. Wenn eine Interaktion zwischen zwei Proteinen untersucht werden sollte, wurden diese für 20 min ohne ATP vorinkubiert.

### 3.5.3. Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität

Kulturen wurden unter anaeroben Bedingungen in TGYEP, das mit 15 mM Natriumformiat, 5  $\mu$ M NiCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> und 1  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> supplementiert war, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bis 1,2 angezogen. Nach der Ernte wurden die Zellen in 50 mM Tris/Cl pH 7,4 gewaschen und in Aufbruchpuffer (50 mM Tris/Cl pH 7,4, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 20  $\mu$ g/ml PMSF) resuspendiert. Mittels Passage durch eine French Press-Zelle bei 118 MPa und anschließender Zentrifugation bei 30000 g wurden Rohextrakte hergestellt. Diese wurden in Serumgläschen durch mehrfaches Entgasen und Begasen unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre gebracht. Die Messung der Gesamtaktivität der Hydrogenasen als H<sub>2</sub>:Benzylviologen-Oxidoreduktase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Ballantine und Boxer (1986) in anaeroben Küvetten, die mit H<sub>2</sub> begast worden waren.

## 3.6. Analyse von Protein-DNA-Interaktionen

### 3.6.1. Gelretardationsexperimente

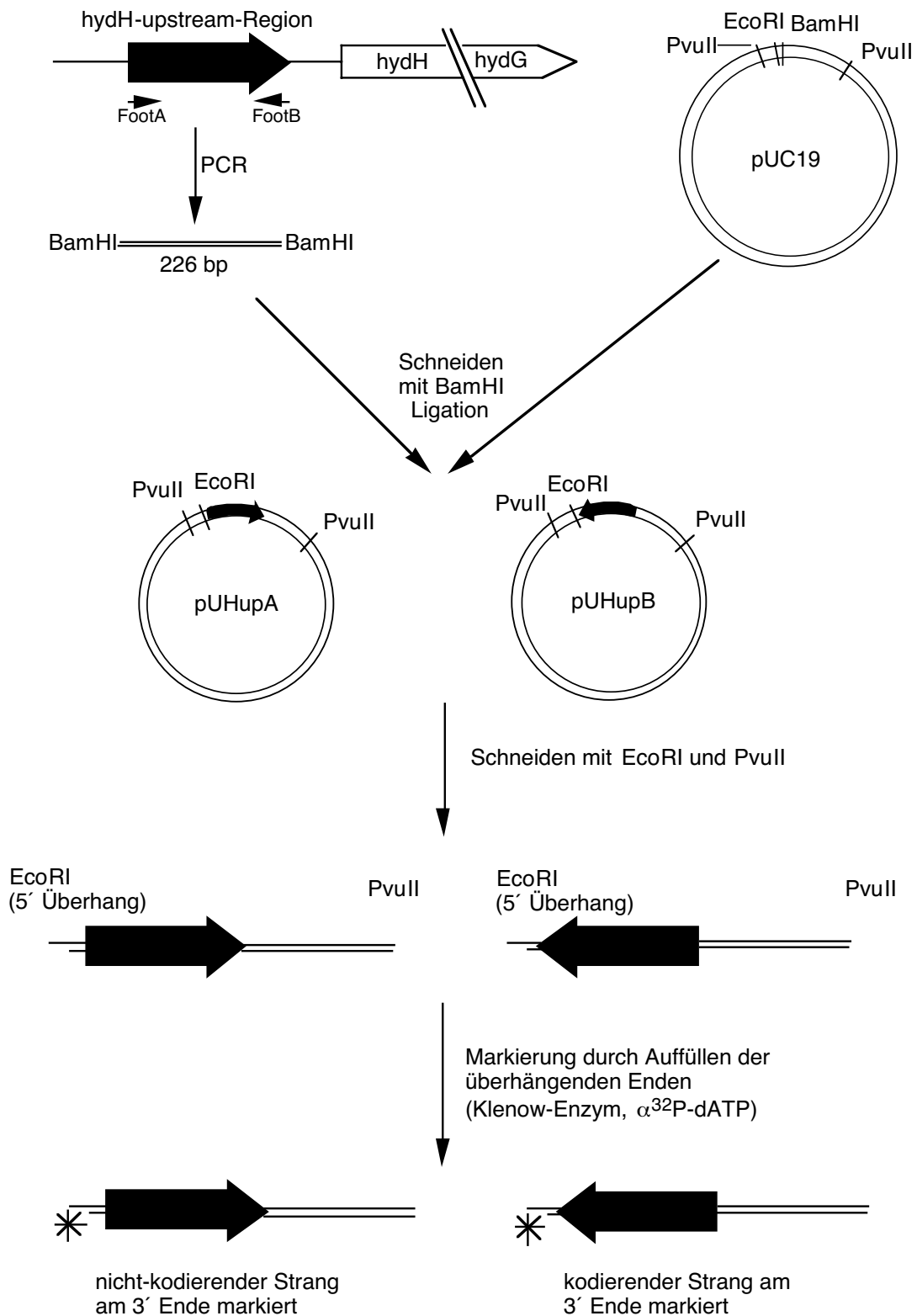
DNA-Fragmente für HydG-DNA-Bindungsstudien wurden durch PCR synthetisiert, wobei genomische DNA aus MC4100 als Matrize diente. Nach Reinigung der Fragmente wurden sie am 5'-Ende mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP markiert. Dazu wurden jeweils 5 pmol DNA mit 30  $\mu$ Ci  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (6000 Ci/mmol) und 20 U T4-Polynukleotid-Kinase für 30 min bei 37 °C inkubiert. 0,01 pmol dieser DNA wurde mit 0,5, 1, 2 oder 5  $\mu$ g gereinigtem HydG in Reaktionspuffer

(100 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM Magnesiumchlorid, 1 mM ATP, 4 mM Spermidin, 10 % Glycerin) inkubiert. Wenn nicht anders erwähnt, wurden Acetylphosphat und Carbamoylphosphat jeweils in einer Konzentration von 50 mM dem Ansatz beigefügt. Die Reaktionsansätze wurden ohne DNA für 10 min bei 25 °C inkubiert. Nach Zugabe der markierten DNA-Fragmente wurden die Ansätze für weitere 20 min bei 25 °C belassen, bevor sie in einem nicht-denaturierenden Gel (5 % Polyacrylamid in TBE-Puffer pH 7,6) aufgetrennt wurden.

### 3.6.2. DNase I Footprinting-Analyse

Die Bindestelle für HydG im *zraP-hydH*-intergenen Bereich wurde durch DNase I Footprinting-Analyse bestimmt. Um die Bindung an beiden DNA-Strängen getrennt untersuchen zu können, war die Präparation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten in zwei Chargen nötig, bei denen jeweils nur ein Ende eines Stranges radioaktiv markiert war. Hierfür wurde wie in Abbildung 4 dargestellt zunächst der Bereich -232 bis -19 relativ zum Startcodon von *hydH* durch PCR mit den Oligonukleotiden FootA und FootB und genomischer DNA aus MC4100 als Matrize amplifiziert. Das erhaltene DNA-Fragment wurde an den 5' und 3' der chromosomalen Region eingeführten Erkennungssequenzen mit *Bam*HI geschnitten und ungerichtet in einen mit dem gleichen Enzym linearisierten Vektor pUC19 ligiert. Dadurch entstanden zwei Plasmide, pUHupA, bei dem die upstream-Region von *hydH* in der Weise in pUC inseriert ist, daß das durch FootA gebildete Ende auf Seite der *Eco*RI-Schnittstelle liegt und das FootB-Ende neben der *Xba*I-Schnittstelle des Polylinkers, und pUHupB, in dem die amplifizierte Region in umgekehrter Orientierung in den Vektor inseriert ist. Je 10 pmol der Plasmide pUHupA und pUHupB wurden mit *Pvu*II und *Eco*RI geschnitten, das 434 bp-lange Fragment mit der upstream-Region von *hydH* wurde isoliert und jeweils an nur einem 3'-Ende markiert durch folgende Auffüllreaktion: 5 pmol DNA wurden mit 5 µl  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (50 µCi, 0,33 µM), 1 µl dTTP, dCTP und dGTP (je 0,1 mM) und 6 U Klenow-Enzym in einem Volumen von 50 µl in Klenow-Enzym-Puffer bei 25 °C inkubiert. Nach 25 min wurde ein Überschuß an nicht-radioaktiven dNTPs zugegeben und nach weiteren 5 min wurde die markierte DNA von den nicht eingebauten Nukleotiden mit Hilfe des Nucleotide Removal Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) abgetrennt. Auf diese Weise wurde bei dem aus pUHupA präparierten Fragment der nicht-kodierende, bei dem aus pUHupB erhaltenen Fragment der kodierende Strang am 3'-Ende markiert.

Für den Footprinting Test wurden 0,05 pmol DNA mit verschiedenen Mengen an gereinigtem HydG im Reaktionspuffer (50 mM Tris/Cl pH 7,5, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP, 4 mM Spermidin, 50 µg/ml Heringssperma-DNA, 10 mM Acetylphosphat und 10 mM Carbamoylphosphat) in einem Volumen von 20 µl 30 min



**Abbildung 4:** Strategie für die Präparation der markierten DNA-Fragmente für die DNase I Footprinting-Analyse der Bindung von HydG an die *hydH/G*-upstream-Region. Kleine Pfeile repräsentieren die in der PCR eingesetzten Oligonukleotide, breite, weiße Pfeile Gene und breite, schwarze Pfeile die *hydH/G*-upstream-Region. Sterne kennzeichnen die Stelle der durch den Einbau von radioaktiven Nukleotiden erfolgten Markierung.

bei 30 °C inkubiert. Danach wurden 5 U DNase I (grade 1, Boehringer, Mannheim, Deutschland) zugegeben und nach einer Minute wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 25 mM und Hefe-tRNA in einer Konzentration von 22,2 µg/ml gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde auf 180 µl gebracht und auf Eis transferiert.

Nach Fällung mit LiCl und Ethanol wurde die Probe in 20 µl Formamid-Auftragspuffer (80 % Formamid, 15 mM EDTA, 10 mM NaOH, Bromphenolblau, Xylencyanol) resuspendiert. Die "G"-Sequenzreaktion nach Maxam und Gilbert (1977) wurde wie in Ausubel *et al.* (1997) beschrieben durchgeführt. Die Fragmente der Footprint- und der Sequenzreaktion wurden auf einem großen denaturierenden Gel (6 % Polyacrylamid, 7 M Harnstoff) aufgetrennt, das danach getrocknet und mit Hilfe eines Phosphoimagers (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California, USA) ausgewertet wurde.

### 3.7. Limitierte Trypsinolyse

Zur Untersuchung von Proteinstrukturen über limitierte Proteolyse wurde die von Möller *et al.* (1987) erarbeitete Methode verwendet. 12,5 µg gereinigtes Protein (FhIA oder FhIA-N) wurden nach 10 min Vorinkubation in Trypsinolyse-Puffer (50 mM Tris/Cl pH 7,4, 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) zum Teil mit zusätzlichen Substanzen mit 250 ng TPCK (Tosylamidophenylethylchloromethylketon)-behandeltem Trypsin bei 28 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer unterbrochen. Die Proteolyseprodukte wurden nach Gelelektrophorese durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

## 4. Immunoblot-Analysen

Der Nachweis von Proteinen in Gelen durch Antikörper erfolgte nach Standardmethoden mit dem ECL-System von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim).

Für FhIA wurde die beschriebene Prozedur mit abgesättigten Antikörpern angewendet (Korsa, 1998). Bei der Detektion von HycE, der großen Untereinheit der Hydrogenase 3, wurde das Antiserum in einer Verdünnung von 1:1500 eingesetzt.

Antikörper gegen HydG wurden mit Hilfe von gereinigtem HydG durch die Firma Davids Biotechnologie (Regensburg) aus Hühnereidottern gewonnen (Huber, 1999) und durch mehrstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem Zellextrakt von MC4100ΔG abgesättigt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wurde in einer 1:2000 Verdünnung verwendet. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte AffiniPure Rabbit anti-Chicken IgY\* von Dianova (Hamburg) in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

## 5. Datenverarbeitung

Radioaktive Gele zur Analyse der Gelretardations- und Footprint-Analysen und 2D-Gele wurden auf Phosphorscreens exponiert, mit einer Auflösung von 100 oder 200  $\mu\text{m}/\text{Pixel}$  am Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California, USA) eingelesen und mit dem Programm ImageQuant Version 1.2 (Molecular Dynamics) ausgewertet.

Gefärbte SDS-Polyacrylamidgele und Filme von Immunoblots und Southern Blots wurden zur Herstellung von Abbildungen mit einem Flachbettscanner (UMAX UC840, UMAX Data Systems Inc.) mit einer geeigneten Auflösung eingelesen und anschließend mit dem Programm Adobe Photoshop 2.5 (Adobe Systems Inc.) und dem Graphikprogramm MacDrawPro (Claris) weiterbearbeitet.

Suche nach Proteinen mit ähnlicher Primärsequenz zu FhIA, HydH, HydG oder Teilen davon erfolgte über Internet am National Institute of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) unter Verwendung des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990). Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm MegAlign (Version 0.97, DNASTAR Inc.) oder GeneWorks (IntelliGenetics Inc.) erstellt.

## ERGEBNISSE

### A Untersuchungen zur Domänenstruktur von FhIA

#### 1. Aktivität von FhIA-C (Aminosäuren 379 bis 693 von FhIA)

##### 1.1. Klonierung von *fhIA-C*

In der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit waren die Eigenschaften der N-terminalen Domäne von FhIA (FhIA-N, Aminosäuren 1 bis 378) untersucht worden. Wie sich herausstellte, ist diese Region in FhIA für die Oligomerisierung des Moleküls und die intramolekulare Signaltransduktion verantwortlich. Das warf die Frage auf, welche Funktionen dem C-terminalen Teil von FhIA (Domänen B bis D, FhIA-C, Aminosäuren 379 bis 693) zugeordnet werden können und auf welche Weise die verschiedenen Domänen zusammenwirken, um derart komplexe und abgestufte Funktionen zu bewirken, wie sie FhIA zeigt.

Für diese Untersuchungen wurde das Plasmid pFHLAC-4 konstruiert, in dem das für FhIA-C kodierende Genfragment (*fhIA-C*, Nukleotide 1 bis 3 und 1135 bis 2079 von *fhIA*) unter der Kontrolle des *fhIA*-eigenen konstitutiven Promotors steht. Dazu wurde ausgehend von Plasmid pSH91 durch inverse PCR mit den Oligonukleotiden IK15 und SL12 und nachfolgende Religation eine entsprechende Deletion in das *fhIA*-Gen eingeführt.

##### 1.2. Konstitutive Transkriptionsaktivierung durch FhIA-C

###### 1.2.1. Auswirkung von anaeroben Bedingungen und Formiat auf die *in vivo*-Aktivität von FhIA-C

Zunächst wurde geprüft, ob FhIA-C alleine alle zur Transkriptionsaktivierung nötigen Funktionen ausüben kann. Tabelle 5 zeigt die Aktivierung der Expression einer *hycA'-lacZ*-Genfusion durch FhIA-C unter verschiedenen Bedingungen und vergleicht sie mit der durch FhIA bewirkten. Das verkürzte Protein ist offensichtlich zur Transkriptionsaktivierung in der Lage, was bedeutet, daß es tatsächlich die für die Interaktion mit  $\sigma^{54}$ -RNA-Polymerase und für die ATP-Bindung und -Hydrolyse verantwortlichen Regionen besitzt. Die Aktivität ist jedoch nicht mehr durch den externen Zusatz von Formiat stimulierbar, wie es für FhIA der Fall ist. Dies ist ein weiterer starker Hinweis darauf, daß Formiat-Bindung und daraus resultierende Aufhebung der intramolekularen Repression durch die N-terminale Domäne von FhIA bewirkt werden. Auch unter anaeroben Bedingungen ist die Aktivität von FhIA-C

nicht gesteigert, sondern sogar verringert. Dies ist auf eine reduzierte Expression von *fhIA-C* vermutlich wegen geringerer Kopienzahl des Plasmids unter anaeroben Bedingungen zurückzuführen, wie durch Immunoblot-Experimente mit FhIA-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Ergebnis nicht gezeigt).

**Tabelle 5:** *in vivo*-Transkriptionsaktivierung einer *hycA*'-*lacZ* Reporterfusion durch FhIA-C. Die Zellen wurden unter aeroben oder anaeroben Bedingungen, mit oder ohne Zusatz von 30 mM Formiat angezogen. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde in Miller-Units bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Parallelen.

Stamm	Sauerstoff- Verfügbarkeit	Zusatz von Formiat	$\beta$ -Galaktosidase- Aktivität
SA22/pSH91	+	-	95
	+	+	1406
	-	-	1855
	-	+	2548
SA22/pFHLAC-4	+	-	2044
	+	+	2043
	-	-	998
	-	+	670

### 1.2.2. Einfluß von überproduziertem HycA auf die Transkriptionsaktivierung durch FhIA-C

Neben Formiat und der Verfügbarkeit von Sauerstoff übt auch das Protein HycA einen Einfluß auf die Aktivität von FhIA<sub>EC</sub> aus. HycA wird vom ersten Gen des *hyc*-Operons kodiert und wirkt antagonistisch zur Transkriptionsaktivierung durch FhIA<sub>EC</sub>. So führt eine Deletion in *hycA* zur Steigerung der Aktivität von FhIA<sub>EC</sub> (Sauter *et al.*, 1992), dagegen hat eine Überproduktion von HycA eine Reduktion der FhIA-Aktivität zur Folge (Hopper, 1995). Ob auch FhIA-C diesem Einfluß unterliegt, wurde *in vivo* untersucht. Wie die Werte aus Tabelle 6 deutlich machen, führt eine Überexpression von *hycA* nicht zu einem Rückgang der Aktivität von FhIA-C, obwohl das Zweiplasmidsystem in der Zelle zu einer verringerten Expression von FhIA-C führt (durch Immunoblot erhaltenes Ergebnis nicht gezeigt).

**Tabelle 6:** Einfluß von überproduziertem HycA auf die Transkriptionsaktivierung durch FhIA-C. Die Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von 30 mM Formiat oder unter aeroben Bedingungen ohne Formiatzusatz angezogen. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde in Miller-Units bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Parallelen.

Stamm	überproduzierte Proteine	Sauerstoff-Verfügbarkeit	Zusatz von Formiat	$\beta$ -Galaktosidase-Aktivität
SA22/ pSH91/pBR322	FhIA	-	+	3867
		+	-	82
SA22/ pSH91/pSH17	FhIA + HycA	-	+	1245
		+	-	2
SA22/ pFHLAC-4/pBR322	FhIA-C	-	+	263
		+	-	500
SA22/ pFHLAC-4/pSH17	FhIA-C + HycA	-	+	423
		+	-	661

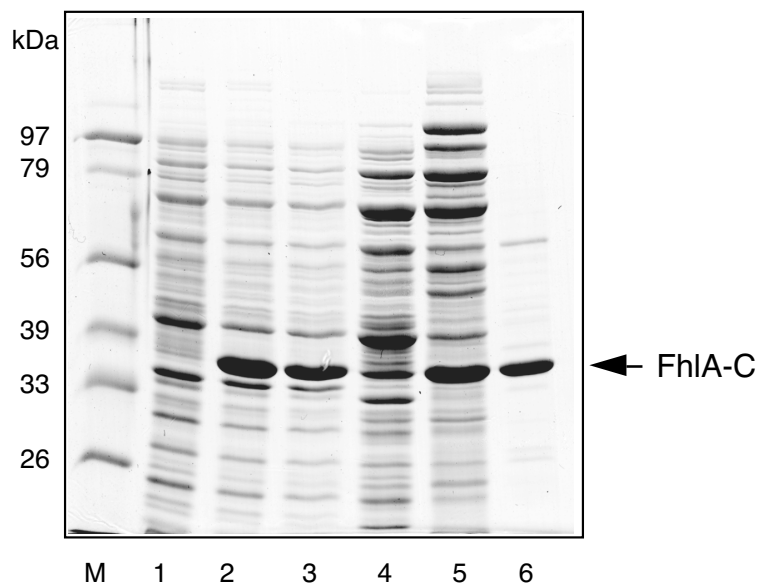
### 1.3. Reinigung von FhIA-C

Für eine detaillierte biochemische Untersuchung der Aktivität von FhIA-C wurde das Protein gereinigt. Zu diesem Zweck wurde das entsprechende Gen, *fhIA-C* in den Überexpressionsvektor pT7-7 kloniert. Durch PCR mit den Oligonukleotiden SLCN2 und SLCC und dem Plasmid pSH91 als Matrize wurde das C-terminale Fragment von *fhIA* (*fhIA-C*, Nukleotide 1135 bis 2076 von *fhIA*) amplifiziert. Auf diese Weise wurde vor dem Leserahmen ein Startcodon und eine *NdeI*-Schnittstelle, nach dem Stoppcodon eine *EcoRI*-Schnittstelle eingeführt. Das Fragment wurde mit den genannten Enzymen geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen behandelten Vektor pT7-7 ligiert. Das entstandene Plasmid pFHLAC-3 enthält das Gen *fhIA-C* unter der Kontrolle des T7-spezifischen Promotors.



Die Überexpression und die darauffolgende Reinigung des Proteins mittels klassischer Methoden erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. Der Verlauf der Reinigung, dargestellt in ihren einzelnen Schritten, ist in Abbildung 5 zu sehen. Aus 10 g Zellen konnten etwa 270 µg Protein gereinigt werden, das zu ca. 80-90 % sauber vorlag. Da die Überexpression sehr gut war, konnte die Reinigung anhand der Bande auf der entsprechenden Höhe im SDS-Polyacrylamidgel verfolgt werden. Das Laufverhalten des überproduzierten Proteins im Gel entsprach der aus der Aminosäuresequenz errechneten Größe von 35 kDa. Das gereinigte Protein wurde auch im Immunoblot mit FhIA-spezifischen Antikörpern identifiziert (Daten nicht gezeigt).

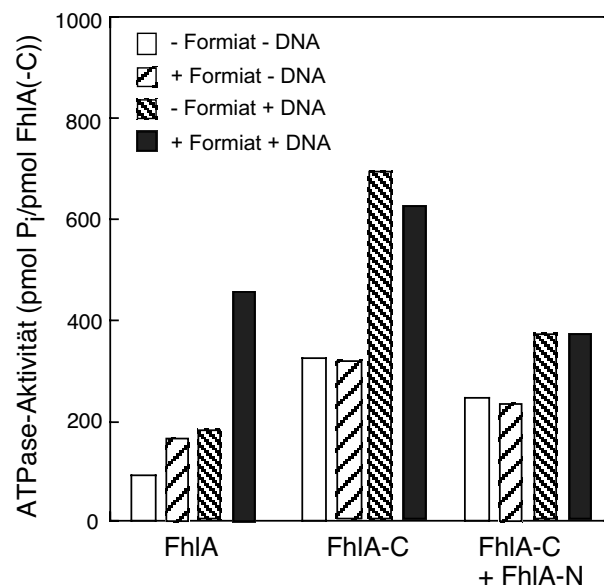
Das Elutionsverhalten von FhIA-C in der Gelfiltration wies auf eine Molekülmasse des nativen Proteins von etwa 39 kDa hin, was bedeutet, daß FhIA-C im Gegensatz zu gereinigtem FhIA (Schlensog *et al.*, 1994) und FhIA-N (Leonhartsberger, 1997) in Lösung als Monomer vorlag. Die Proteinlösung war klar und farblos, das Absorptionsspektrum wies keine Besonderheiten auf.



**Abbildung 5:** Überexpression und Reinigung von FhIA-C. Der Verlauf der Reinigung wurde analysiert durch 10 % SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung. M: Molekularer Massenstandard; 1: SDS-Lysat vor Induktion; 2: SDS-Lysat bei Ernte; 3: Rohextrakt; 4: Überstand der 100000 g-Zentrifugation; 5: gelöster Niederschlag der Ammoniumsulfatfällung; 6: gereinigtes FhIA-C nach Mono Q-Anionenaustausch-Chromatographie.

#### 1.4. ATPase-Aktivität von FhIA-C

Um zu eruieren, ob die *in vivo* bestimmte konstitutive Aktivität von FhIA-C auf eine im Vergleich zu FhIA veränderte ATPase-Aktivität zurückzuführen ist, und um die enzymatischen Eigenschaften genauer zu untersuchen, wurde das gereinigte Protein in den für FhIA ausgearbeiteten ATPase-Test (Hopper und Böck, 1995) eingesetzt. Dabei wurden der Reaktion in einigen Fällen Formiat und DNA zugesetzt. Das doppelsträngige DNA-Fragment SL1-2 enthält die DNA-Bindestelle von FhIA aus der intergenen Region zwischen *hycA* und *hypA*, das Fragment SH8-9 einen Bereich aus der 5'-Region von *fdhF*, der nicht von FhIA gebunden wird. Wie vorangegangene Experimente gezeigt hatten (Hopper und Böck, 1995), führen Formiat und DNA zu einer Stimulierung der ATPase-Aktivität von FhIA, wobei Formiat und DNA synergistisch wirken und das UAS enthaltende Fragment zu einer höheren Aktivitätssteigerung führt als die unspezifische DNA.



**Abbildung 6:** ATPase-Aktivität von FhIA-C. Die *in vitro*-ATPase-Aktivität von gereinigtem FhIA-C und FhIA-C nach Vorinkubation mit einem 10fachen molaren Überschuss an FhIA-N wurde im Vergleich zu FhIA bestimmt.

Wie aufgrund der *in vivo*-Ergebnisse zu erwarten, katalysierte gereinigtes FhIA-C ATP-Hydrolyse (Abbildung 6). Diese ATPase-Aktivität von FhIA-C war unter allen getesteten Bedingungen deutlich höher als die von FhIA. Auch in diesem Test war die Aktivität von FhIA-C unabhängig von der Gegenwart von Formiat. Die Konstitutivität der *in vivo*-Transkriptionsaktivierung durch FhIA-C ist also direkt auf konstitutive ATPase-Aktivität zurückzuführen. Dagegen reagierte FhIA-C auf die Zugabe von DNA, welche die UAS

enthält, in gleicher Weise wie FhIA. Die Aktivität konnte auf etwa den doppelten Wert gesteigert werden. Zusatz von unspezifischer DNA (SH8-9), führte wie bei FhIA zu einer geringeren Aktivitätssteigerung (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, daß FhIA-C tatsächlich DNA binden kann, was die Funktionalität des C-terminalen Helix-Turn-Helix-Motives von FhIA bestätigt.

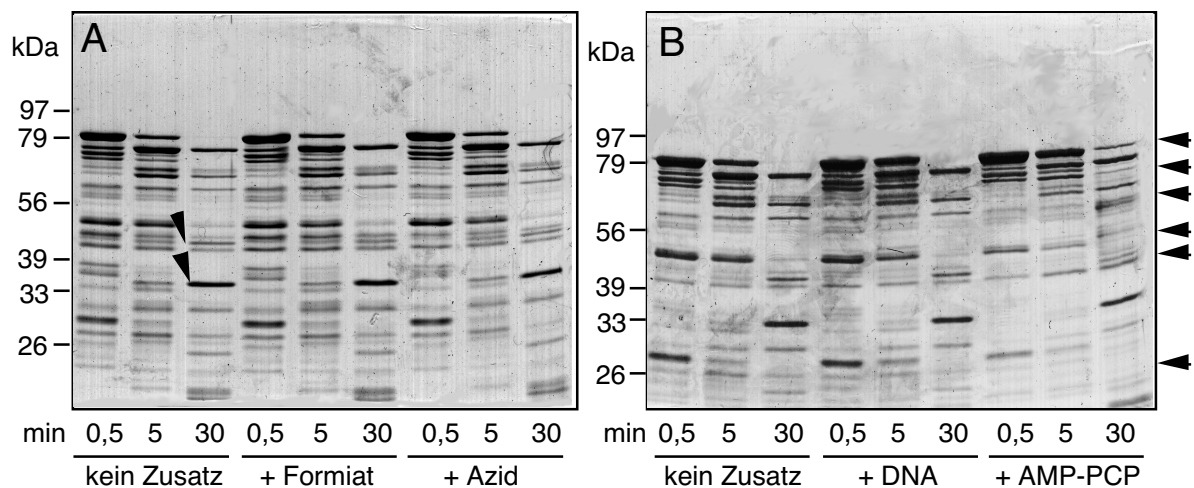
Da sowohl FhIA-C als auch FhIA-N als gereinigte Proteine zur Verfügung standen, konnte die Möglichkeit einer Interaktion zwischen beiden Proteinen untersucht werden. Dabei sollte vor allem die Frage geklärt werden, ob eine Interaktion der beiden FhIA-Teile zu einer Rekonstitution eines funktionellen Vollängen-FhIAs führt. Dazu wurde FhIA-C zusammen mit einem 10fachen molaren Überschuß an FhIA-N, das selbst keine ATPase-Aktivität zeigt (Leonhartsberger, 1997), vor der eigentlichen ATP-Hydrolyse inkubiert. Wie Abbildung 6 zu entnehmen ist, ist die Aktivität unter allen getesteten Bedingungen im Vergleich zu FhIA-C etwas reduziert. Dies ist auf einen Aktivitätsverlust von FhIA-C durch die Vorinkubation zurückzuführen und war auch schon im entsprechenden Versuch mit FhIA beobachtet worden (Leonhartsberger *et al.*, 2000). Auch nach Vorinkubation mit FhIA-N zeigt die Aktivität von FhIA-C Stimulierbarkeit durch DNA, aber nicht durch Formiat. Es konnte also kein Einfluß von FhIA-N auf die Aktivität von FhIA-C gefunden werden. Insbesondere interagieren beide Proteine nicht in der Weise miteinander, daß ein Proteinkomplex mit gleichen Eigenschaften wie FhIA entsteht.

## 2. Untersuchungen zur Domänenstruktur durch limitierte Proteolyse

Limitierte Proteolyse ist eine Methode zur Untersuchung von Proteinstrukturen, die auf der Tatsache beruht, daß kompakt gefaltete Proteindomänen oft weniger leicht zugänglich für Proteasen sind als die Übergänge zwischen einzelnen Domänen oder andere exponierte Stellen (Jurnak, 1985). Durch Proteolyse mit Trypsin unter limitierenden Bedingungen entstehen daher oft relativ stabile Zwischenprodukte, deren Analyse Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur der Proteine erlaubt (Forchhammer *et al.*, 1990; Negishi *et al.*, 1995). Die Anwendung dieser Technik auf FhIA sollte Aufschluß über die Existenz von Domänen geben, wobei besonders von Interesse war, ob sich Domänen zeigen, die FhIA-C oder FhIA-N entsprechen. Dies würde die tatsächliche Existenz der abgeleiteten Domänen bestätigen. Darüberhinaus sollte untersucht werden, ob sich Unterschiede im Proteolyse-musters ergeben, wenn Formiat, DNA oder ein nicht-hydrolysierbares ATP-Analogon im Ansatz enthalten sind, was für eine Konformationsänderung von FhIA nach Bindung der Substanzen sprechen würde.

Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, erfolgt ein sehr schneller Abbau von FhIA in viele Hydrolyseprodukte. Dies ist darauf zurückzuführen, daß FhIA insgesamt 81 theoretische

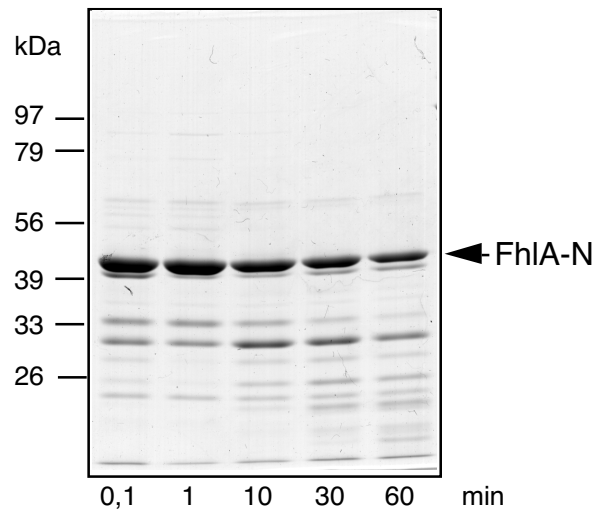
Spaltstellen für Trypsin enthält, von denen offensichtlich sehr viele zugänglich sind. Deutlich ist jedoch die Anreicherung eines Fragmentes von etwa 34 kDa Größe im Zeitverlauf des Experimentes zu beobachten (Pfeil in Abbildung 7). Dieses Spaltprodukt entspricht von der Größe her FhIA-C und könnte bedeuten, daß sich die durch Sequenzvergleich ermittelten Domänen B, C und D von FhIA tatsächlich in eine kompakte Struktur falten. Dies würde auch gut mit der Tatsache übereinstimmen, daß wie oben gezeigt das entsprechend verkürzte Protein FhIA-C als solches aktiv ist. Ebenso ist ein prominentes Spaltprodukt von etwa 43 kDa zu erkennen, welches FhIA-N entsprechen würde. Limitierte Trypsinolyse mit dem gereinigten FhIA-N zeigt, daß dieses Protein tatsächlich eine kompakte Faltung aufweist, da es sich insgesamt in Gegenwart der Protease stabiler als FhIA erweist (Abbildung 8). Selbst nach 60 min Reaktion ist noch Vollängenprotein vorhanden.



**Abbildung 7:** Verlauf der limitierten Trypsinolyse von FhIA in Gegenwart verschiedener Liganden. Gereinigtes FhIA wurde in Gegenwart von 10 mM Formiat, 1 mM Natriumazid (A) bzw. 10  $\mu$ M DNA (SL1-2), 10 mM AMP-PCP (B) oder ohne Zusätze einer limitierten Proteolyse unterworfen. Nach 30 s, 5 und 30 min wurde die Reaktion gestoppt, die Reaktionsprodukte in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Schräge Pfeile im Gel zeigen die prominenten Spaltprodukte von 34 und 43 kDa Größe. Die Pfeile rechts kennzeichnen Positionen von Reaktionsprodukten im Reaktionsansatz mit AMP-PCP, die Unterschiede im Vergleich zur Reaktion ohne Zusätze zeigen.

Eine Konformationsänderung von FhIA in Folge einer Liganden-Bindung läßt sich weder in Gegenwart von Formiat, noch von Azid, einem Strukturanalogen von Formiat, oder einem doppelsträngigen DNA-Fragment, das die FhIA-Bindestelle enthält, nachweisen. Unter keiner der genannten Bedingungen zeigt sich ein verändertes Hydrolysemuster von FhIA. Dagegen führt die Zugabe von AMP-PCP, einem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogen, zu einer veränderten Suszeptibilität gegenüber Trypsin. Wie Abbildung 7 B zeigt, ergeben sich

in Anwesenheit von AMP-PCP andere FhIA-Spaltprodukte als in seiner Abwesenheit, was ein starker Hinweis auf eine Konformationsänderung von FhIA in Reaktion auf ATP-Bindung ist.



**Abbildung 8:** Limitierte Trypsinolyse von FhIA-N. 6 s bzw. 1, 10, 30 und 60 min nach Zugabe der Protease wurde die Reaktion gestoppt; die Reaktionsprodukte wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

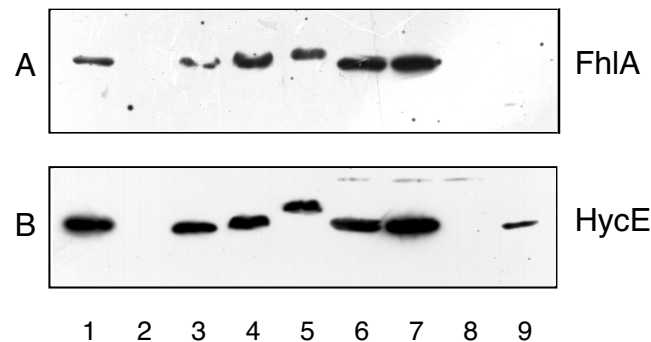
Da die limitierte Trypsinolyse vielversprechende Ergebnisse geliefert hatte, die Proteolyseprodukte wegen ihrer Vielzahl jedoch nicht identifiziert werden konnten, wurde der Versuch unternommen, durch sogenanntes Protein Footprinting (Jensen *et al.*, 1995b) die Domänenstruktur von FhIA und die mit Substrat-Bindung einhergehenden strukturellen Veränderungen genauer zu untersuchen. Bei dieser Technik wird jeweils ein Ende des Proteins radioaktiv markiert, wodurch die Identifizierung der durch limitierte Proteolyse mit einer Anzahl von verschiedenen Enzymen entstehenden Fragmente möglich gemacht wird. *fhlA* wurde zu diesem Zweck so in Vektoren (Jensen *et al.*, 1995a) kloniert, daß es an jeweils einem Ende mit einem Reinigungs-Tag, am anderen mit einer Erkennungssequenz für eine Proteinkinase fusioniert wurde. Es war jedoch nicht möglich, diese Fusionsproteine in stabiler Form überzuproduzieren und zu reinigen. Spätestens das Abspalten des Reinigungs-Tags führte zu einer Präzipitation des Proteins. Daher konnte diese Methode bei FhIA nicht zum Einsatz kommen.

## B Verbreitung des Formiat-Regulons in Organismen der Familie der Enterobacteriaceae

Zu Beginn dieser Arbeit lag Information zur Struktur und Funktion des Transkriptionsaktivators FhIA nur für das Protein von *E. coli* vor. Es war nicht einmal bekannt, ob die Regulation des FHL-Komplexes ein auf *E. coli* beschränktes System darstellt, oder in anderen Spezies in gleicher Weise erfolgt. Lediglich für *Salmonella typhimurium* war die partielle Sequenz eines zu *fhIA* homologen Gens berichtet worden (Mills *et al.*, 1995). Da man aus dem Vergleich der Sequenz und Funktion verschiedener FhIA-Orthologe weitere Information zur Domänenstruktur und zum Wirkungsmechanismus des Regulators erhalten kann, wurde ein umfassendes Screening innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae durchgeführt. Die Organismen *S. typhimurium* TL117, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* M5a1, *K. terrigena* 2687, *Proteus vulgaris* 2140, *P. mirabilis* 30115 und *Serratia marcescens* 3012 wurden dafür ausgewählt.

### 1. Vorkommen von FhIA in verschiedenen Enterobakterien

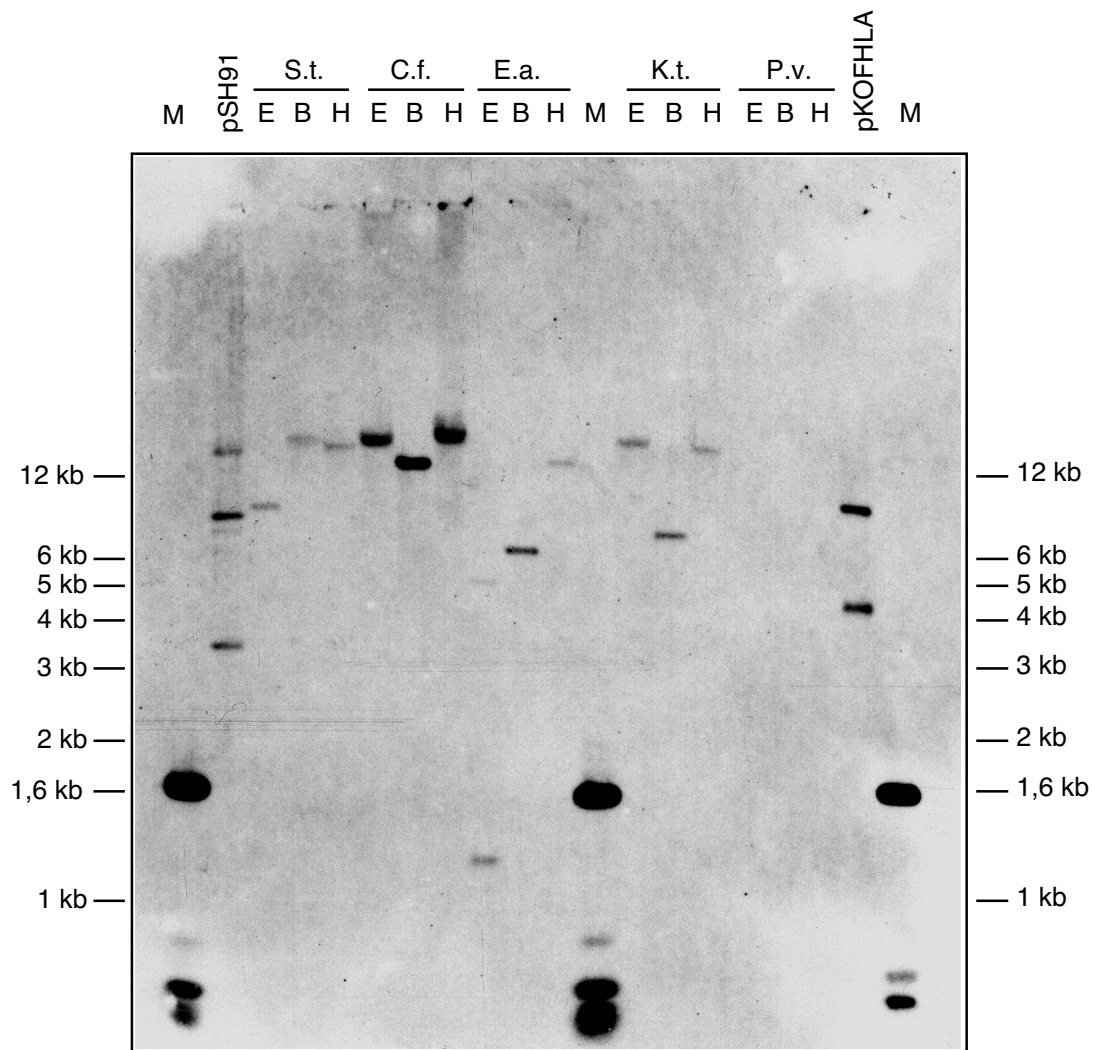
In einem ersten Test wurde untersucht, ob sich durch Immunoblot-Analyse mit gegen FhIA<sub>Ec</sub> gerichteten Antikörpern in den oben genannten Organismen ein kreuzreagierendes Protein nachweisen läßt. Wie in Abbildung 9 zu sehen, besitzen *S. typhimurium*, *E. aerogenes*, *C. freundii* und beide untersuchten *Klebsiella*-Arten jeweils ein Protein, das mit den Antikörpern reagiert und eine ähnliche molekulare Masse wie FhIA aufweist. Die Annahme, daß es sich bei diesen Proteinen um FhIA-Orthologe handelt, wird unterstützt durch die Tatsache, daß sich in den gleichen Organismen ein Protein findet, das mit anti-HycE-Antikörpern reagiert. HycE, die große Untereinheit der Hydrogenase 3, ist ein Bestandteil des von FhIA regulierten FHL-Komplexes. Vermutlich existiert in den genannten Spezies also ein zum FHL-Komplex von *E. coli* homologes System, das auch ähnlich reguliert wird. *P. mirabilis* und *P. vulgaris* (nicht gezeigt) zeigen ein schwaches Signal mit anti-HycE-, aber keines mit anti-FhIA-Antikörpern. *S. marcescens* reagiert mit beiden Antikörpern nicht, besitzt also entweder beide Proteine überhaupt nicht oder in einer Form, die von den Antikörpern nicht erkannt wird.



**Abbildung 9:** Verbreitung von FhIA und HycE in verschiedenen Enterobakterien. SDS-Lysate der Organismen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und in einem Immunoblot mit anti-FhIA- (A) oder anti-HycE-Antikörpern (B) detektiert. 1: MC4100, 2: SA2( $\Delta$ fhlA), 3: *S. typhimurium*, 4: *C. freundii*, 5: *K. terrigena*, 6: *K. oxytoca*, 7: *E. aerogenes*, 8: *S. marcescens*, 9: *P. mirabilis*.

Gleichzeitig wurden alle Organismen auf ihre Fähigkeit untersucht, in Komplexmedium mit Glucose unter anaeroben Bedingungen Gas zu bilden (Tabelle 7). Alle getesteten Organismen außer *K. oxytoca* zeigten Gasbildung.

Schließlich wurden sechs der Spezies auch auf DNA-Ebene auf die Existenz eines *fhlA*-Gens getestet. Zu diesem Zweck wurde die genomische DNA der Organismen mittels DNA-DNA-Hybridisierung im Southern Blot analysiert. Hierbei dienten zwei verschiedene PCR-Fragmente des *fhlA*-Gens von *E. coli* als Sonde. Abbildung 10 zeigt, daß *S. typhimurium*, *C. freundii*, *E. aerogenes* und *K. terrigena* offensichtlich ein *fhlA*-Gen besitzen, *P. vulgaris* dagegen nicht. Auch DNA aus *K. oxytoca* reagierte im Hybridisierungsversuch (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 10:** Southern Blot mit *fhlA*-spezifischer Sonde und DNA aus verschiedenen Enterobakterien. Genomische DNA von *S. typhimurium* (*S.t.*), *C. freundii* (*C.f.*), *E. aerogenes* (*E.a.*), *K. terrigena* (*K.t.*) und *P. vulgaris* (*P.v.*) wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen (E: *EcoRI*, B: *BamHI*, H: *HindIII*) geschnitten; die Fragmente wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und durch Southern Blot analysiert. Ebenfalls aufgetrennt wurden die ungeschnittenen Plasmide pSH91 (*fhlA*<sub>Ec</sub>, Positivkontrolle) und pKOFHLA (siehe Kapitel B 2.). Als Sonde diente ein 5'-terminales Fragment (Nukleotide 13 bis 726) von *fhlA*. M: Größenstandard.

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse des Screenings im Überblick. Zusammenfassend kann man feststellen, daß in den meisten Fällen das Signal auf DNA-Ebene mit der Nachweisbarkeit in beiden Immunoblots und der Gasproduktion unter anaeroben Bedingungen korreliert. FhIA findet sich also in mehreren der untersuchten Spezies der Familie Enterobacteriaceae, nämlich in *S. typhimurium*, *C. freundii*, *E. aerogenes*, *K. terrigena* und *K. oxytoca* und ist nicht auf *E. coli* beschränkt.



**Tabelle 7:** Ergebnisse des Screenings verschiedener Enterobakterien auf Existenz von Komponenten des Formiat-Regulons. -: negativ bzw. kein Signal; (+): sehr schwache Reaktion; +, ++: normale, starke Reaktion; n. d.: nicht bestimmt. Getestet wurde die Gasbildung aus Glucose unter anaeroben Bedingungen in Komplexmedium, die Reaktion von SDS-Lysaten der Organismen im Immunoblot mit anti-FhIA- und anti-HycE-Antikörpern und die Hybridisierung der chromosomalen DNA im Southern Blot mit zwei verschiedenen Sonden. nt: Nukleotide.

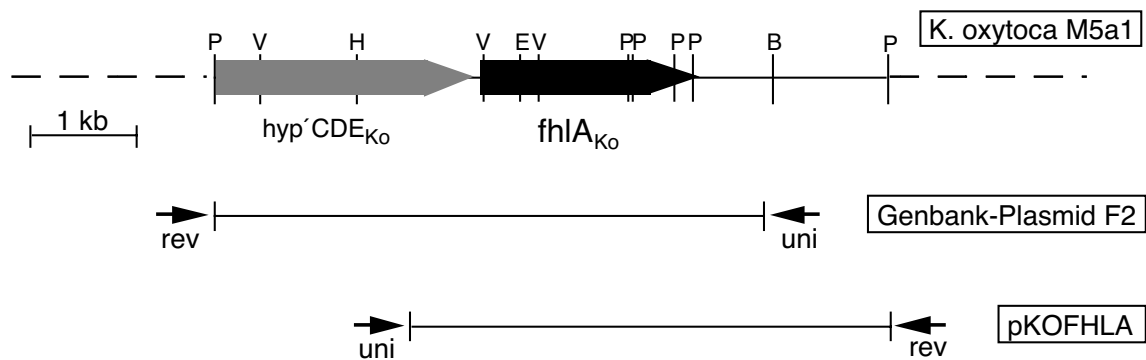
Organismus	Gas- produktion	FhIA- Immuno- blot	HycE- Immuno- blot	Southern Blot (Sonde nt 227- 1044 von <i>fhIA</i> )	Southern Blot (Sonde nt 13-726 von <i>fhIA</i> )
<i>S. typhimurium</i> TL117	++	+	+	+	+
<i>C. freundii</i>	++	+	+	+	+
<i>E. aerogenes</i>	++	+	+	-	+
<i>K. oxytoca</i> M5a1	-	+	+	+	n.d.
<i>K. terrigena</i> 2681	(+)	+	+	n.d.	+
<i>P. vulgaris</i> 2140	+	-	(+)	-	-
<i>P. mirabilis</i> DSM 30115	++	-	(+)	n.d.	n.d.
<i>S. marcescens</i> 30121	(+)	-	-	n.d.	n.d.

## 2. Sequenzvergleich der orthologen FhIA-Proteine aus *K. oxytoca*, *E. aerogenes* und *S. typhimurium* mit FhIA aus *E. coli*

Ein Vergleich der FhIA-Orthologe mit FhIA aus *E. coli* setzt die Klonierung der entsprechenden Gene mit anschließender Sequenzierung und Funktionsanalyse voraus. Hierfür wurden die Organismen *K. oxytoca*, *E. aerogenes* und *S. typhimurium* ausgewählt.

Die Strategie zur Isolierung von *fhIA<sub>Ko</sub>* beruhte wegen des hohen Verwandtschaftsgrades von *K. oxytoca* mit *E. coli* auf einem funktionellen Komplementationsansatz. SA22, ein *E. coli*-Stamm, der eine Deletion in *fhIA* und eine *hycA*'-*lacZ*-Reporterfusion in der  $\lambda$ -Attachment-Site des Chromosoms besitzt, wurde mit einer Bank von genomischer DNA aus *K. oxytoca* M5a1 transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf MacConkey-Laktose-Platten, die mit 30 mM Formiat supplementiert waren. Rote Kolonien deuteten auf eine funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase hin, was wiederum auf die Aktivierung der Expression von *hycA* beziehungsweise der entsprechenden Fusion durch FhIA zurückgeführt werden kann. Unter 70000 untersuchten Kolonien fanden sich sechs mit stabiler Rotfärbung.

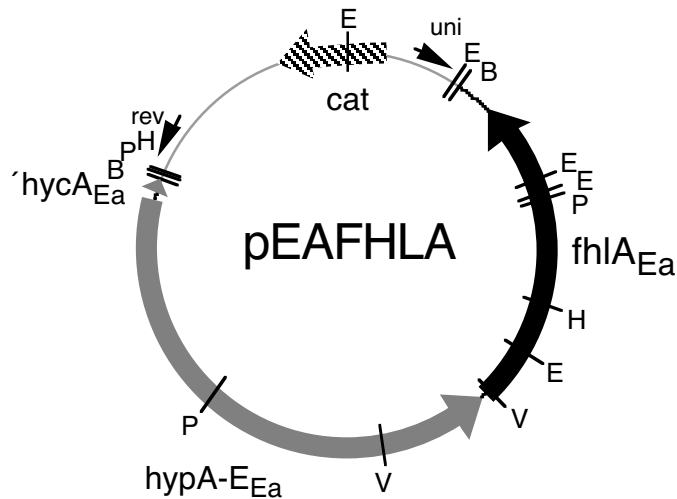
Die Plasmide aus diesen Zellen wurden isoliert und durch Sequenzierung und Restriktionskartierung analysiert. Eines der Plasmide enthält Sequenzen, die Homologie zu *lacY* und *lacI* aus *E. coli* aufweisen; es trägt deswegen vermutlich das Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase aus *K. oxytoca*. Zwei weitere Plasmide zeigten Sequenzen, die homolog zu denen von *hydG* und *hydH* von *E. coli* sind, sie werden in einem späteren Kapitel dieser Arbeit behandelt. Die restlichen drei Plasmide, von denen zwei identisch waren, enthielten überlappende genomische Fragmente mit *fhIA* aus *K. oxytoca*. Diese wurden einer umfassenden Restriktionskartierung unterzogen (Abbildung 11). Restriktions- und Sequenzanalyse zeigten, daß in *K. oxytoca* wie in *E. coli* das *fhIA*-Gen 3' zu den Genen *hypC*, *hypD* und *hypE* liegt. Das kleinere Plasmid mit einem 4,6 kb großen Insert, das *fhIA* und einen Teil des *hypE*-Gens enthält, wurde mit pKOFHLA bezeichnet und für die Funktionsanalyse verwendet.



**Abbildung 11:** *fhIA*<sub>Ko</sub>-enthaltenden Plasmide. Sequenzierter Ausschnitt aus dem Genom von *K. oxytoca* M5a1 und Inserts der beiden aus der Genbank isolierten Plasmide. Die Abbildungen sind maßstabsgetreu. Schnittstellen von Restriktionsenzymen B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, V: *Eco*RV, P: *Pst*I, H: *Hind*III. Große Pfeile repräsentieren Gene, kleine Pfeile hybridisierende Oligonukleotide, die die Insertionsrichtung in pSU2719 veranschaulichen sollen.

Bei der Klonierung von *fhIA* aus *E. aerogenes* fand das gleiche Prinzip der Komplementation Anwendung. Zuerst wurde auf Basis der durch den Southern Blot erhaltenen Informationen eine partielle Genbank von *E. aerogenes* konstruiert. Genomische DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten, Fragmente der Länge zwischen 5,5 und 7 kb wurden isoliert und in einen mit *Bam*HI linearisierten Vektor pSU2719 ligiert. SA22 wurde mit dieser partiellen Genbank transformiert und die Kolonien wie oben beschriebenen selektiert. Von den positiven Kolonien wurde das Plasmid präpariert und durch Sequenzierung und Restriktionskartierung analysiert (Abbildung 12). Es enthält auf einem 6 kb großem Insert *fhIA*<sub>Ea</sub> hinter den Genen *hypA*<sub>Ea</sub> bis *hypE*<sub>Ea</sub>. Auch in diesem Organismus ist der genomische

Kontext von *fhIA* also identisch dem von *E. coli*. Die Sequenz von *fhIA<sub>Ea</sub>* wurde bestimmt und das Plasmid wurde als pEAFHLA für weitere Versuche verwendet.



**Abbildung 12:** Plasmidkarte von pEAFHLA. Schnittstellen von Restriktionsenzymen B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, V: *Eco*RV, P: *Pst*I, H: *Hind*III. Die Abbildung ist maßstabsgetreu. Große Pfeile repräsentieren Gene, kleine Pfeile hybridisierende Oligonukleotide. *cat*: Chloramphenicolacetyltransferase-Gen.

Schließlich wurde noch die Sequenz von *fhIA<sub>St</sub>* aus *S. typhimurium* ausgehend von Cosmid pDL8-1 bestimmt. Der C-terminale Teil war schon von Mills *et al.*, (1995) sequenziert worden, wobei ein im Vergleich zum *E. coli*-Gen verlängertes 3'-Ende gefunden worden war. Das Gen wurde nun komplett sequenziert, die Extension stellte sich dabei als Sequenzierfehler heraus.

Die auf diese Weise bestimmten DNA- und die daraus abgeleiteten Protein-Sequenzen der FhIA-Orthologen (GenBank-Zugangsnummern AF232731, AF232732 und AF232733) wurden untereinander und mit denjenigen von *E. coli* verglichen (Abbildung 13). Der Anteil an identischen Aminosäuren mit FhIA<sub>Ec</sub> beträgt bei FhIA von *K. oxytoca* und *E. aerogenes* jeweils 84 %, bei FhIA<sub>St</sub> sogar 90 %. Die Identität der Gensequenzen mit *fhIA<sub>Ec</sub>* ist 77 % für *fhIA<sub>Ko</sub>* und *fhIA<sub>Ea</sub>*, 80 % für *fhIA<sub>St</sub>*. Die größte Ähnlichkeit innerhalb der vier Proteine zeigen FhIA<sub>Ea</sub> und FhIA<sub>Ko</sub> mit 95 % identischen Resten (entspricht 87 % Identität auf DNA-Ebene). Der Identitätsgrad der Gene und Proteine spiegelt also den phylogenetischen Verwandtschaftsgrad wieder. Bei allen FhIA-Orthologen erstreckt sich diese außerordentlich hohe Ähnlichkeit über die gesamte Länge des Proteins.

## Ergebnisse

Fh1A K.o.	MSYTPMGDLG	QQGLFDITRI	LLQQPDLAAL	SEITLRLVQQ	SALADRAAII	LWHSNGHRAT	RHACDDAGHP	VSYED	75
Fh1A E.a.	MSYTPMGDLG	QQGLFDITRI	LLQQPDLAAL	SEITLRLVQQ	SALADRAAII	LWNHGNHRAA	RYACDDAGQP	ASYED	75
Fh1A E.c.	MSYTPMSDLG	QQGLFDITRI	LLQQPDLASL	SEALSQLVKR	SALADNAIIV	LWQAQTORAS	YYASREKDTP	IKYED	75
Fh1A S.t.	MSYTPMSDLG	QQGLFDITRI	LLQQPDLASL	SEALSQLVKR	SALADSAGIV	LWQAQSQRAD	YYATRENGRP	VEYED	75
Fh1A K.o.	ETVLANGPVR	RILSRPDALH	CSATIFAETW	PQLARSGLYP	IFGMYCLLPL	AAEGRIFGGC	EFIRDDNRPW	TEKEY	150
Fh1A E.a.	ETVLANGPVR	RILSRPDALH	CONVIFAETW	PQLAASGLYP	IFGMYCLLPL	AAEGRIFGGC	EFIRDDNRPW	SEKEY	150
Fh1A E.c.	ETVLANGPVR	SILSRPDILH	CSYEEFQETW	PQLDAGGLYP	KFGHYCLMPL	AAEGRIFGGC	EFIRYDDRPW	SEKEF	150
Fh1A S.t.	ETVLANGPVR	RILSRPDALH	CNFHEFITETW	PQLAASGLYP	IFGMYCLLPL	AAEGRIFGGC	EFIRQEDRPW	SEKEY	150
Fh1A K.o.	QRLHTFTQIV	AVVTEQIQSR	VSNNDVDYDLL	CHERDNFRIL	VAITNAVLSR	LDIDELVSEV	AKEIHRYFRI	DAISV	225
Fh1A E.a.	QRLHTFPAQIV	AVVTEQIQSR	VSNNDVDYDLL	CHERDNFRIL	VAITNAVLSR	LDIDELVSEV	AKEIHRYFRI	DAISV	225
Fh1A E.c.	NRLQFTTQIV	SVVTEQIQSR	VNNNDVDYELL	CRERDNFRIL	VAITNAVLSR	LDMDLVSEV	AKEIHRYFRI	DDISI	225
Fh1A S.t.	DRLHTFTQIV	GVVTEQIQNR	VNNNDVDYDLL	CRERDNFRIL	VAITNAVLSR	LDIDELVSEV	AKEIHRYFNI	DAISI	225
Fh1A K.o.	VLRSHRKNKL	NIYSTHYLDA	SHPVHDOSEV	DEAGTLTERV	FKSKEMLLN	LHEHDLAPY	EKMLFEMWPN	KIQTL	300
Fh1A E.a.	VLRSHRKNKL	NIYSTHYLDA	SHPVHDOSEV	DEAGTLTERV	FKSKEMLLN	LHEHDSLAPY	EKMLFEMWPN	KIQTL	300
Fh1A E.c.	VLRSHRKNKL	NIYSTHYLDK	CHPAHEOSEV	DEAGTLTERV	FKSKEMLLN	LHERDDLAPY	ERMLFDTWGN	KIQTL	300
Fh1A S.t.	VLRSHRKNKL	NIYSTHYLDE	HHPAHEOSEV	DEAGTLTERV	FKSKEMLLN	LNERDLAPY	ERMLFDTWGN	KIQTL	300
Fh1A K.o.	CLLPLMSGNT	LLGVLKLAQC	DEKVFTTINL	KLLRQIAERV	SIAMDNALAY	REIQRKLERL	VDENLALTEQ	LNNVE	375
Fh1A E.a.	CLLPLMSGNT	LLGVLKLAQC	DEKVFTTINL	KLLRQIAERV	SIAMDNALAY	REIQRKLERL	VDENLALTEQ	LNNVE	375
Fh1A E.c.	CLLPLMSGDT	MLGVLKLAQC	EKVFVTTINL	NLLRQIAERV	AIAMDNALAY	QEIHRKLERL	VDENLALTEQ	LNNVD	375
Fh1A S.t.	CLLPLMSGKT	MLGVLKLAQC	EKVFVTTINL	KLLRQIAERV	AIAMDNALAY	QEIHRKLERL	VDENLALTEQ	LNNVD	375
Fh1A K.o.	SEFGEIIGRS	EAMNSVLKQV	EMVAQSDSTV	LILGETGTGK	ELIARAIHNL	SGRNSRRMVK	MNCAAMPAGL	LES DL	450
Fh1A E.a.	SEFGEIIGRS	EAMNSVLKQV	EMVAQSDSTV	LILGETGTGK	ELIARAIHNL	SGRNGRRMVK	MNCAAMPAGL	LES DL	450
Fh1A E.c.	SEFGEIIGRS	EAMYSVLKQV	EMVAQSDSTV	LILGETGTGK	ELIARAIHNL	SGRNNRRMVK	MNCAAMPAGL	LES DL	450
Fh1A S.t.	SEFGEIIGRS	EAMYNVLKQV	EMVAQSDSTV	LILGETGTGK	ELIARAIHNL	SGRSRRMVK	MNCAAMPAGL	LES DL	450
Fh1A K.o.	FGHERGAF TG	ASAQRIGRFE	LADKSSLFLD	EVGDMPLEQ	PKLLRVLQEQ	EFERLGSNKL	TQTDVRLIAA	TNRDL	525
Fh1A E.a.	FGHERGAF TG	ASAQRIGRFE	LADKSSLFLD	EVGDMPLEQ	PKLLRVLQEQ	EFERLGSNKL	TQTDVRLIAA	TNRDL	525
Fh1A E.c.	FGHERGAF TG	ASAQRIGRFE	LADKSSLFLD	EVGDMPLEQ	PKLLRVLQEQ	EFERLGSNKL	TQTDVRLIAA	TNRDL	525
Fh1A S.t.	FGHERGAF TG	ASAQRIGRFE	LADKSSLFLD	EVGDMPLEQ	PKLLRVLQEQ	EFERLGSNKL	TQTDVRLIAA	TNRDL	525
Fh1A K.o.	KRMVADREFR	SDLYYRLNVF	PIHLPLRER	PEDIPLLAKA	FTFKIARRLG	RNIDSIPAET	LRILSRMEWP	GNVRE	600
Fh1A E.a.	KRMVADREFR	SDLYYRLNVF	PIHLPLRER	PEDIPLLAKA	FTFKIARRLG	RNIDSIPAET	LRILSRMEWP	GNVRE	600
Fh1A E.c.	KRMVADREFR	SDLYYRLNVF	PIHLPLRER	PEDIPLLAKA	FTFKIARRLG	RNIDSIPAET	LRILSRMEWP	GNVRE	600
Fh1A S.t.	KRMVADREFR	NDLYYRLNVF	PIQLPLRER	PEDIPLLAKA	FTFKIARRMG	RNIDSIPAET	LRILSRMEWP	GNVRE	600
Fh1A K.o.	LENVIERAVL	LTRGNVLQLS	LPEMNIQEQ	LAA--EVLPE	EGEDEYQLIV	RVLKESNGVV	AGPKGAAQRL	GLKRT	673
Fh1A E.a.	LENVIERAVL	LTRGNVLQLS	LPEMHIEQET	LAP--EVLPE	EGEDEYQLIV	RVLKESNGVV	AGPKGAAQRL	GLKRT	673
Fh1A E.c.	LENVIERAVL	LTRGNVLQLS	LPDITVPEPE	TPPAATVVAL	EGEDEYQLIV	RVLKESNGVV	AGPKGAAQRL	GLKRT	675
Fh1A S.t.	LENVIERAVL	LTRGNVLQLS	LPDITAVTPD	TSPVATESAK	EGEDEYQLII	RVLKESNGVV	AGPKGAAQRL	GLKRT	675
Fh1A K.o.	TLLSRMKRLG	INKDRLV							690
Fh1A E.a.	TLLSRMKRLG	INKDRLV							690
Fh1A E.c.	TLLSRMKRLG	IDKSALI							692
Fh1A S.t.	TLLSRMKRLG	IDKDALA							692

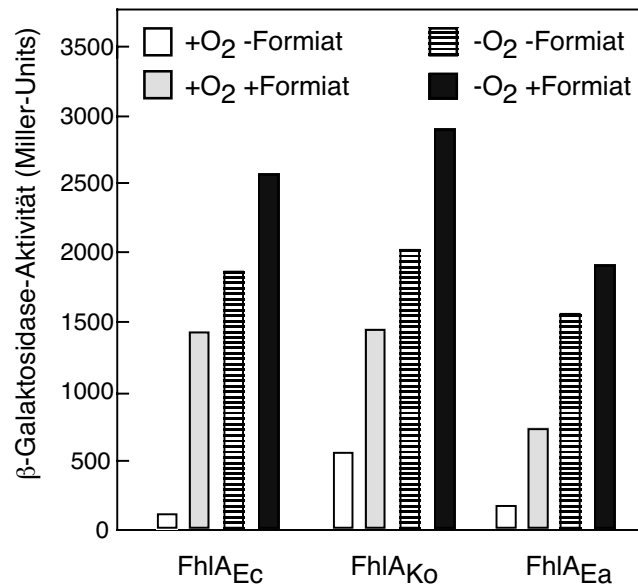
**Abbildung 13:** Alignment der Fh1A-Sequenzen von *K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *S. typhimurium* und *E. coli*. Aminosäuren, die in allen vier Spezies identisch sind, sind eingerahmt, Reste, die in mindestens zwei Proteinen gleich sind, sind grau hinterlegt.

### 3. Aktivität von FhIA<sub>Ea</sub> und FhIA<sub>Ko</sub>

FhIA von *K. oxytoca* und *E. aerogenes* waren aufgrund ihrer Fähigkeit identifiziert worden, eine *hycA*'-*lacZ*-Fusion aus *E. coli* zu aktivieren. Daher liegt die Vermutung nahe, daß diese Proteine FhIA<sub>EC</sub> in der Aktivierung aller vier Transkriptionseinheiten des Regulons funktionell ersetzen können. Dies wurde durch den Test auf Gasproduktion unter fermentativen Bedingungen untersucht. SA2 ( $\Delta fhIA$ ) reagiert negativ, da das Fehlen des Aktivators FhIA eine Bildung des FHL-Komplexes unmöglich macht. Die Transformation von SA2 mit den Plasmiden pKOFHLA (*fhIA<sub>Ko</sub>*) oder pEAFHLA (*fhIA<sub>Ea</sub>*) stellt genau wie mit pSH91 (*fhIA<sub>EC</sub>*) die Fähigkeit zur Gasproduktion wieder her. FhIA<sub>Ko</sub> und FhIA<sub>Ea</sub> sind also in der Lage, die physiologische Rolle von FhIA<sub>EC</sub> in *E. coli* zu übernehmen.

#### 3.1. Stimulation der Aktivität von FhIA<sub>Ea</sub> und FhIA<sub>Ko</sub> durch Formiat und Anaerobiose

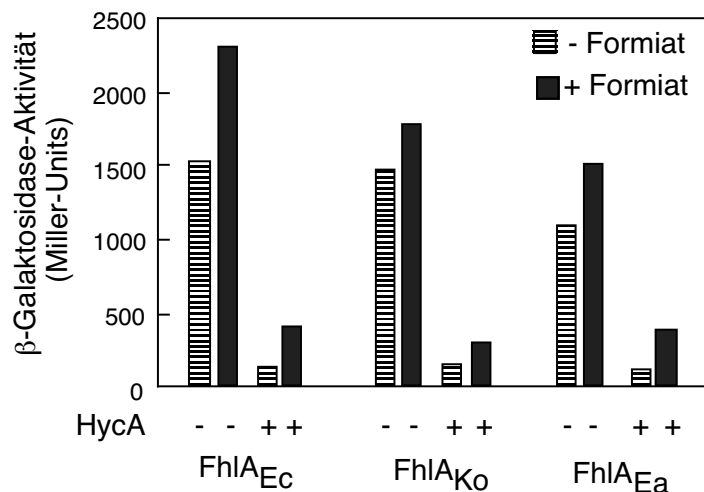
Die Expressionsaktivierung durch FhIA<sub>EC</sub> ist von anaeroben Bedingungen und von der Anwesenheit von Formiat im Medium abhängig. Daß dies auch für die orthologen Proteine aus *K. oxytoca* und *E. aerogenes* zutrifft, wurde in *E. coli* mit Hilfe einer *hycA*'-*lacZ*-Fusion in einem *fhIA*-Deletionsstamm gezeigt (Abbildung 14). Auch die Aktivität von FhIA<sub>Ko</sub> und FhIA<sub>Ea</sub> läßt sich nämlich sowohl durch die Zugabe von externem Formiat als auch durch anaerobe Wachstumsbedingungen deutlich steigern. In Abwesenheit von Sauerstoff und gleichzeitiger Anwesenheit von extern zugegebenem Formiat konnte die stärkste Aktivität beider Proteine gemessen werden. FhIA<sub>Ko</sub> und FhIA<sub>Ea</sub> besitzen also die gleichen Eigenschaften wie das Protein von *E. coli*.



**Abbildung 14:** Effekt von Formiat und Sauerstoff auf die Transkriptionsaktivierung durch FhIA<sub>Ko</sub> und FhIA<sub>Ea</sub> im Vergleich zu FhIA<sub>Ec</sub>. Es wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in SA22/pKOFHLA (FhIA<sub>Ko</sub>), SA22/pEAFHLA (FhIA<sub>Ea</sub>) und SA22/pSH91 (FhIA<sub>Ec</sub>) bestimmt. Die Zellen wurden unter aeroben oder anaeroben Bedingungen, mit oder ohne Zusatz von 30 mM Formiat angezogen. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Parallelen.

### 3.2. Einfluß von HycA<sub>Ec</sub> auf die Aktivität von FhIA<sub>Ea</sub> und FhIA<sub>Ko</sub>

Die Überproduktion von HycA übt einen stark antagonistischen Effekt auf die Transkriptionsaktivierung durch FhIA aus (Hopper, 1995). Es wurde nun untersucht, ob auch die Aktivitäten von FhIA<sub>Ko</sub> und FhIA<sub>Ea</sub> durch HycA von *E. coli* beeinflusst werden. Sowohl in An- wie auch in Abwesenheit von extern zugegebenem Formiat führt eine Überproduktion von HycA zu einem dramatischen Rückgang der Aktivitäten der beiden FhIA-Orthologe (Abbildung 15). Auch FhIA<sub>Ko</sub> und FhIA<sub>Ea</sub> zeigen also dieselbe Suszeptibilität gegenüber HycA von *E. coli* wie FhIA<sub>Ec</sub>.



**Abbildung 15:** Effekt von überproduziertem HycA auf die Transkriptionsaktivierung durch FhIA<sub>Ko</sub> und FhIA<sub>Ea</sub>. Es wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in SA22/pKOFHLA (FhIA<sub>Ko</sub>), SA22/pEAFHLA (FhIA<sub>Ea</sub>) und als Vergleich SA22/pSH91 (FhIA<sub>Ec</sub>) gemessen. *hycA* wurde von Plasmid pSH17 überexprimiert, als Kontrolle diente pBR322. Die Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen mit oder ohne Zusatz von 30 mM Formiat angezogen. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Parallelen.

#### 4. Überproduktion und Untersuchung der Löslichkeit von FhIA<sub>Ea</sub> und FhIA<sub>Ko</sub>

Durch die Resultate der vorangegangenen Untersuchungen war klar geworden, daß das FhIA-Regulationssystem nicht nur in *E. coli* existiert, sondern weiter verbreitet ist. Sequenz- und Funktionsvergleich von FhIA<sub>Ko</sub> und FhIA<sub>Ea</sub> mit FhIA<sub>Ec</sub> ergaben Hinweise darauf, daß zwischen den drei Proteinen ein sehr hoher Grad an Ähnlichkeit hinsichtlich Funktion und Struktur besteht. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob eine Überproduktion von FhIA<sub>Ko</sub> oder FhIA<sub>Ea</sub> in löslicher Form möglich ist, um große Mengen dieser FhIA-Orthologen für Strukturuntersuchungen zum Beispiel durch Kristallisation zu gewinnen. Natives FhIA<sub>Ec</sub> konnte bis zu diesem Zeitpunkt nur in geringer Menge gereinigt werden, da dieses Protein bei Überproduktion zur Aggregation neigt.

Aus diesem Grund wurden *fhIA<sub>Ko</sub>* und *fhIA<sub>Ea</sub>* in den Überexpressionsvektor pT7-7 kloniert. Dazu wurden die jeweiligen Gene durch PCR mit den Oligonukleotiden FhIAEaKo-N und FhIAEa-C (*fhIA<sub>Ea</sub>*) bzw. FhIAEaKo-N und FhIAKo-C (*fhIA<sub>Ko</sub>*) und pEAFHLA oder pKOFHLA als Matrize amplifiziert und gereinigt. Die Enden wurden mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten und die Fragmente in einen mit denselben Enzymen behandelten Vektor pT7-7 ligiert. Die entstandenen Plasmide pTKOFA und pTEAFA enthalten die Gene *fhIA<sub>Ko</sub>* und *fhIA<sub>Ea</sub>* unter Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-spezifischen  $\Phi 10$ -Promotors.

Überexpressionversuche mit BL21(DE3)/pTKOFA und BL21(DE3)/pTEAFA zeigten eine starke Überproduktion von FhIA<sub>Ko</sub> und FhIA<sub>Ea</sub> nach Inkubation mit 500  $\mu$ M IPTG bei 37 °C für mindestens 2 h, jedoch lag fast das gesamte überproduzierte Protein in Form von Einschlusskörperchen vor (Ergebnisse nicht gezeigt). Durch Induktion mit 100  $\mu$ M IPTG und Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Überproduktion gedrosselt, wodurch zwar ein etwas größerer Anteil von FhIA<sub>Ko</sub> und FhIA<sub>Ea</sub> in der löslichen Fraktion zu finden war, der überwiegende Anteil jedoch auch hier als Einschlusskörperchen vorlag (Ergebnisse nicht gezeigt). Leider konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt also weder von FhIA<sub>Ko</sub> noch von FhIA<sub>Ea</sub> größere Mengen an löslichem Protein erhalten werden.

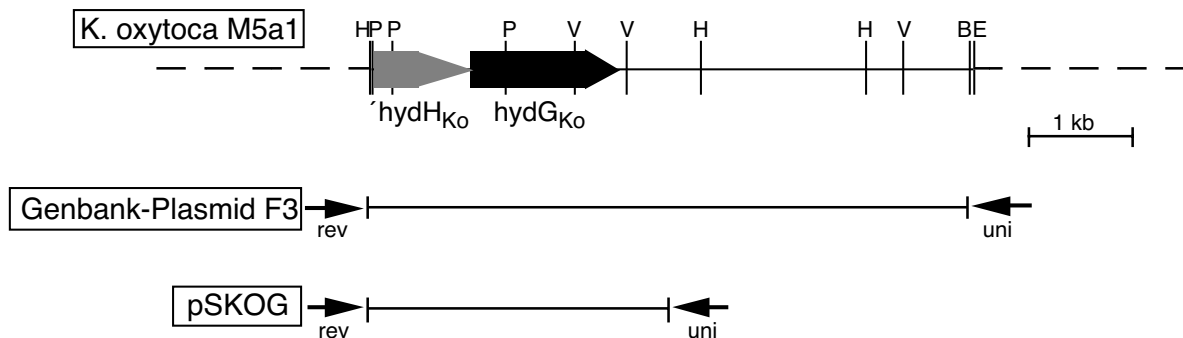


## C Untersuchungen zur Aktivität und Funktion des Zwei-Komponenten-Systems HydH/G

### 1. "Cross-talk" des Zwei-Komponenten-Systems HydH/G mit dem Formiat-Regulon

#### 1.1. Klonierung und Sequenzierung von *hydG*<sub>Ko</sub> und *hydH*<sub>Ko</sub>

Im Zuge der Suche nach dem orthologen *fhIA*-Gen von *K. oxytoca* wurden in einer Genbank unter anderem zwei Plasmide identifiziert, die in den *E. coli*-Stamm SA22 ( $\Delta fhIA$ , *hycA*'-*lacZ*) eingebracht die Expression einer funktionellen  $\beta$ -Galaktosidase bewirkten, was auf eine Aktivierung der Transkription der *hycA*'-*lacZ*-Reporterfusion zurückzuführen ist (siehe B 2.). Restriktions- und Sequenzanalysen ergaben, daß beide Plasmide einen offenen Leserahmen enthalten, der einen hohen Grad an Identität zu *hydG* von *E. coli* aufweist, sowie den 3'-Bereich eines Gens, das homolog zu *hydH* aus *E. coli* ist (Abbildung 16). Das Plasmid mit dem kürzeren Stück der chromosomalen DNA (2,7 kb) wurde pSKOG genannt und für weitere Analysen verwendet.



**Abbildung 16:** *hydH*'<sub>Ko</sub>/*hydG*<sub>Ko</sub>-enthaltende Plasmide aus der Genbank von *K. oxytoca* M5a1. Sequenzierter Ausschnitt aus dem Genom von *K. oxytoca* M5a1 und Inserts der beiden aus der Genbank isolierten Plasmide. Die Abbildungen sind maßstabsgetreu. Schnittstellen von Restriktionsenzymen B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, V: *Eco*RV, P: *Pst*I, H: *Hind*III. Große Pfeile repräsentieren Gene, kleine Pfeile Oligonukleotide, die die Insertionsrichtung in pSU2719 veranschaulichen sollen.

Das auf pSKOG kodierte *hydG* wurde sequenziert. Die vollständige Sequenz von *hydH* wurde durch Sequenzierung des durch PCR amplifizierten genomischen Abschnitts erhalten. Hierfür wurden die Oligonukleotide HydH5, dessen Sequenz innerhalb des auf pSKOG kodierten Teiles von *hydH* liegt, und HydHA1, welches mit der Region 5' von *hydH* in der analogen Sequenz von *E. coli* paart, verwendet. Für die Sequenzierung von 288

Basen des 5'-Bereichs von *hydH* wurde das entsprechende Stück des Genoms mittels PCR mit den Oligonukleotiden HydH8 und HupA amplifiziert. HydH8 liegt in *hydH* und HupA hybridisiert mit dem Anfang von *hupA*, einem Gen, dessen Start in *E. coli* 1645 bp 5' von *hydH* liegt und in *E. coli*, *S. typhimurium* und *S. marcescens* hoch konserviert ist. Es konnte ein PCR-Produkt der Länge erhalten werden, die dem Abschnitt in *E. coli* entsprach, das bedeutet, daß diese Region auf dem Chromosom von *K. oxytoca* wie in *E. coli* organisiert ist. Für die Sequenzierung wurde DNA aus mehreren unabhängigen PCR-Ansätzen verwendet. Die vollständige Sequenz des *hydH/G*-enthaltenen Genomabschnitts von *K. oxytoca* einschließlich des 5'-Bereiches von *hydH* ist unter der GenBank-Zugangsnummer AF305914 abrufbar.

*hydH* von *K. oxytoca* ist ein Gen von 1392 bp Länge, wovon pSKOG den 3'-Bereich ab Base 519 enthält. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von HydH aus *K. oxytoca* umfaßt 463 Aminosäuren und weist 64 % Identität zu HydH aus *E. coli* auf. *hydG* überlappt mit dem offenen Leserahmen von *hydH* um vier Basen und besitzt eine Länge von 1332 bp. Die abgeleitete Aminosäuresequenz besteht aus 443 Resten und zeigt 83 % Identität zu HydG aus *E. coli*. Als ausschlaggebende Sequenz von *E. coli* wurde die von Blattner *et al.* (1997) bestimmte verwendet, welche mehrere Unterschiede zu der zuerst von Stoker *et al.* (1989) publizierten zeigt.

HydH und HydG aus *E. coli* stellen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu NtrB/C (siehe Anhang) höchstwahrscheinlich ein Zwei-Komponenten-System dar, wobei HydH das Sensorprotein, HydG der Regulator ist. Die Analyse des Hydropathieprofils von HydH (Eisenberg *et al.*, 1984; Kyte und Doolittle, 1982) zeigte die Existenz von mindestens zwei sehr hydrophoben Bereichen, die Transmembrandomänen darstellen könnten (Huber, 1999). Lokalisationsstudien mit radioaktiv markiertem HydH aus *E. coli* ergaben, daß HydH tatsächlich ein integrales Membranprotein ist (Huber, 1999; Leonhartsberger *et al.*, 2001a). Aufgrund der Arbeiten von Stoker *et al.* (1989) wurde postuliert, daß es sich bei HydH/G um das Regulationssystem für die labile Hydrogenase, also Hydrogenase 3 aus *E. coli* handelt. Obwohl Untersuchungen von Schlenzog und Böck (1990) FhIA als Transkriptionsregulator des FHL-Systems einschließlich der Hydrogenase 3 identifizierten, bestand die Möglichkeit der Existenz von überlappenden Regulationskreisen, in denen das Zwei-Komponenten-System HydH/G unter anderen Bedingungen als FhIA aktiv ist. Da auch die Färbung von SA22/pSKOG auf MacConkey-Laktose-Platten auf eine Aktivierung der Expression von *hycA* hinwies, sollte die Aktivität des HydH/G-Systems aus *K. oxytoca* und *E. coli* genauer untersucht werden, um zu klären, welche Gene von HydH/G reguliert werden und welcher Stimulus sensiert wird.

## 1.2. Klonierung von *hydG<sub>Ec</sub>* und Konstruktion von *hydH*- und *hydG*-Deletionsmutanten in *E. coli*

Für die Untersuchung der Funktion von HydH/G in *K. oxytoca* und *E. coli* wurde als erstes ein Plasmid konstruiert, welches das Gen *hydG* aus *E. coli* enthält und zwar in ähnlichem genetischen Hintergrund wie *hydG<sub>Ko</sub>* in pSKOG. Zu diesem Zweck wurde das komplette *hydH/G*-Operon von *E. coli* dadurch in den Vektor pT7-7 kloniert, daß durch PCR mit den Oligonukleotiden HydH-N und HydG-C und genomischer DNA aus MC4100 als Matrize das DNA-Fragment des Operons amplifiziert wurde. Durch die Oligonukleotide wurde direkt am 5'-Ende von *hydH* eine *NdeI*-Schnittstelle und 3' von *hydG* eine *EcoRI*-Erkennungssequenz eingeführt. Nach dem Schneiden des PCR-Produktes mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurde das Fragment in einen mit den gleichen Enzymen behandelten Vektor pT7-7 ligiert. Aus dem auf diese Weise entstandenen Plasmid pHYDHG wurde das *BstXI/EcoRI*-Fragment isoliert, mit Klenow-Enzym behandelt und in einen mit *SmaI* linearisierten Vektor pSU2719 ligiert. Das resultierende Plasmid pSECG enthält *hydH* ab Nukleotid 568 und das komplette *hydG*-Gen. Mit pSECG ist es möglich, die Expression von *hydG<sub>Ec</sub>* direkt mit der von *hydG<sub>Ko</sub>* zu vergleichen.

Um die Funktion von *hydG* und *hydH* zu untersuchen, war es nötig, das jeweilige Gen auf dem Chromosom von verschiedenen *E. coli*-Stämmen durch "in frame"-Deletionen zu inaktivieren. Zu diesem Zweck wurden zuerst die Plasmide pHYDH und pHYDG konstruiert, welche Derivate des Vektors pT7-7 sind, die das Gen *hydH* beziehungsweise *hydG* von *E. coli* enthalten. Dabei wurde in gleicher Weise vorgegangen wie bei der Konstruktion von pHYDHG (siehe oben). Für die PCR für pHYDH wurden die Oligonukleotide HydH-N und HydH-C verwendet, für pHYDG entsprechend HydG-N und HydG-C. Hierauf wurden die Nukleotide 359 bis 985 von *hydG* durch Schneiden von pHYDG mit *Eco47III* entfernt. Die Insertion von vier 5'-GGGATCCC-3'-Linkern und die anschließende Religation ergab pΔHYDG. pHYDH wurde mit *PvuII* und *BstXI* geschnitten und die Nukleotide 568 bis 979 von *hydH* wurden entfernt. Nach Behandlung mit Klenow-Enzym wurden vier Kopien des Linkers 5'-CGGAATTCCG-3' eingefügt und das Plasmid wurde religiert (pΔHYDH). Die *XbaI*-Fragmente von pΔHYDG und pΔHYDH wurden schließlich in die *NheI*-Schnittstelle von pMAK700 eingefügt, wodurch pMAKΔG und pMAKΔH entstanden. Nach der Methode von Hamilton *et al.* (1989) wurden die chromosomalen Gene *hydH* beziehungsweise *hydG* von EM66 durch die entsprechenden "in frame"-Deletionen ersetzt. Durch das in diesem Stamm in mittelbarer Nähe des *hydH/G*-Operons lokalisierte Gen für die Tetracyclin-Resistenz war es nun möglich, die Deletion durch Transduktion mit P1-Phagen (Miller, 1992) in andere Stämme zu transferieren.

### 1.3. Aktivierung des Formiat-Regulons durch HydG<sub>Ko</sub>

Die im Genbank-Screening entdeckte, durch HydG<sub>Ko</sub> vermittelte Aktivierung der Expression der *hycA'*-*lacZ*-Fusion wurde durch Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität quantifiziert. Der Stamm SA22( $\Delta$ *fhIA*, *hycA'*-*lacZ*)/pSKOG zeigte unter anaeroben Bedingungen in TGYEP-Medium eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von 2269 Miller-Units, gegenüber 5 Miller-Units mit dem Vektor pSU2719. Diese Aktivierung der Expression von *hycA* ist sehr hoch und liegt im Bereich der im Wildtypstamm durch FhIA vermittelten Expressionsaktivierung. Im Gegensatz zur Aktivität von FhIA ist die von HydG jedoch kaum durch den Zusatz von 30 mM Formiat stimulierbar (2421 Miller-Units). Auch die Überexpression von *hycA*, die üblicherweise eine Reduktion der Aktivität von FhIA zur Folge hat, hat keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität von HydG (Daten nicht gezeigt). Dagegen ist die Aktivität von HydG<sub>Ko</sub> in höchstem Maße abhängig vom Sauerstoff-Zustand der Zelle: unter aeroben Anzuchtbedingungen beträgt die gemessene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von SA22/pSKOG nur 7 % im Vergleich zur Aktivität nach anaerober Anzucht.

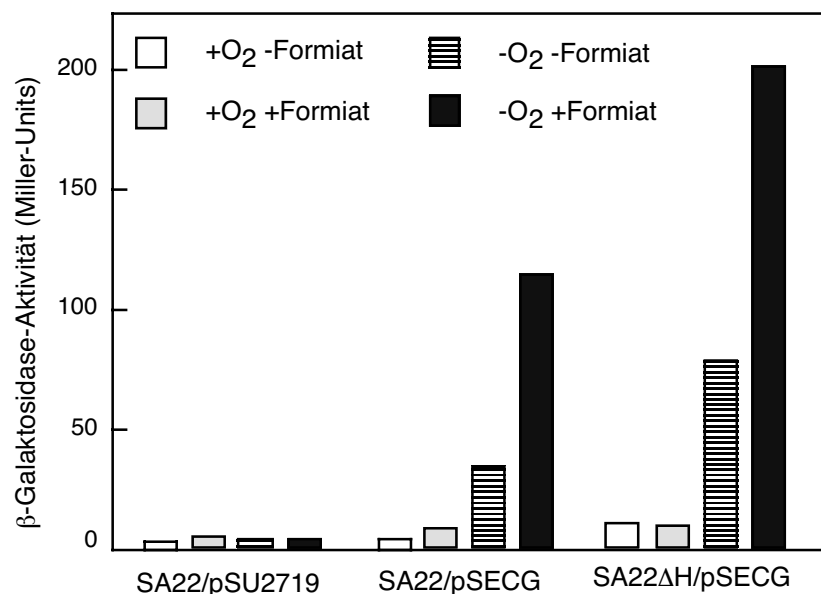
Wie in einer vorangegangenen Diplomarbeit gezeigt werden konnte (Huber, 1999), ist HydG darüberhinaus in der Lage, eine *fdhF'*-*lacZ*-Fusion zu aktivieren. HydG<sub>Ko</sub> kann also im heterologen System unter diesen Bedingungen eine Deletion im *fhIA*-Gen funktionell komplementieren, was durch eine wiederhergestellte Gasproduktion des Stammes SA2/pSKOG unter anaeroben Bedingungen deutlich wird.

Plasmidkodiertes HydG<sub>Ko</sub> ist demnach unter anaeroben Bedingungen in der Lage, die Transkription von *hycA'*-*lacZ*- und *fdhF'*-*lacZ*-Fusionen in *E. coli* zu aktivieren. Nun stellte sich die Frage, ob HydG<sub>Ko</sub> dabei von HydH<sub>Ec</sub> durch Phosphorylierung aktiviert wird, da der potentielle physiologische Sensor HydH<sub>Ko</sub> nicht im Meßsystem enthalten ist. Der *hydH*-Deletionsstamm SA22 $\Delta$ H/pSKOG zeigte eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von nur noch 47 % im Vergleich zu SA22/pSKOG (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, daß die Aktivität von HydG<sub>Ko</sub> tatsächlich zu einem gewissen Ausmaß von dem heterologen Sensor HydH<sub>Ec</sub> abhängt. Diese Abhängigkeit ist jedoch nicht ausschließlich, sondern HydG muß entweder seine Wirkung auch im unphosphorylierten Zustand ausüben oder durch unspezifische Komponenten über das als "cross-talk" bekannte Phänomen aktiviert werden.

### 1.4. Unspezifische Aktivierung der Expression von *hycA* durch HydG<sub>Ec</sub>

Nachdem eine Aktivierung des Formiat-Regulons von *E. coli* durch HydG<sub>Ko</sub> im heterologen System gezeigt werden konnte, sollte die Funktion des HydH/G-Systems hinsichtlich seiner Beteiligung an der Regulation der Expression des FHL-Systems näher untersucht werden. Diese Untersuchungen wurden jedoch mit HydG<sub>Ec</sub> im homologen System

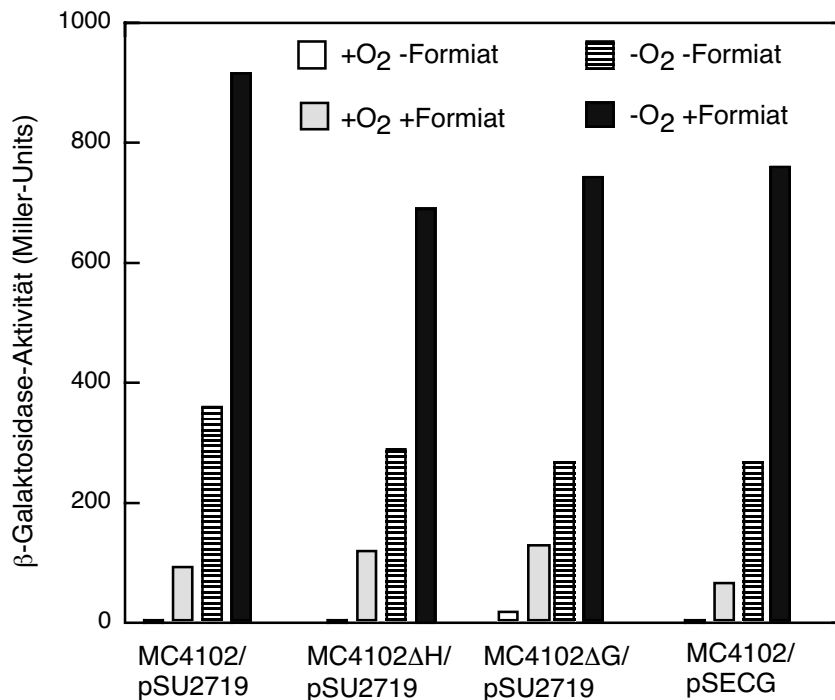
durchgeführt, um unphysiologische Effekte zu vermeiden. Wie Abbildung 17 zeigt, führte die Überexpression von plasmidkodiertem HydG<sub>Ec</sub> (pSECG) zu einer Aktivierung der Expression der *hycA'*-*lacZ*-Fusion, jedoch beträgt das Ausmaß der Aktivierung weniger als 10 % der mit HydG<sub>Ko</sub> erhaltenen Werte (siehe C 1.3.). Auch die Aktivität von HydG<sub>Ec</sub> ist wie die von HydG<sub>Ko</sub> von anaeroben Bedingungen abhängig. Gleichzeitig zeigte sich, daß eine Zugabe von Formiat trotz Abwesenheit eines funktionellen *fhIA*-Gens unter anaeroben Bedingungen die Transkription der *hycA'*-*lacZ*-Fusion weiter erhöht. Wie die für SA22/pSU2719 gemessene Aktivität zeigt, ist chromosomal kodiertes HydG jedoch unter den gewählten Bedingungen nicht an der Regulation der Expression von *hycA* beteiligt. Auch bewirkt eine Deletion in *hydH* keinen Rückgang der Aktivität von HydG, wie im Falle einer klassischen Regulationskaskade zu erwarten wäre, was wiederum ein sehr starker Hinweis darauf ist, daß diese Aktivität von HydG einschließlich der Induktion unter anaeroben Bedingungen und in Gegenwart von Formiat unspezifisch ist.



**Abbildung 17:** Einfluß von HydH/G<sub>Ec</sub> auf die Aktivierung einer *hycA'*-*lacZ*-Fusion. Zellen wurden in TGYEP-Medium unter aeroben oder anaeroben Bedingungen in Anwesenheit oder Abwesenheit von 30 mM Formiat kultiviert.  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Miller-Units angegeben und sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit jeweils drei Parallelen.

Zusätzlich wurde untersucht, welchen Einfluß das HydH/G-System auf die *hycA*-Expression unter Wildtyp-Bedingungen hat (Abbildung 18). MC4102/pSU2719 zeigt das typische FhIA-vermittelte Regulationsmuster, nämlich die Stimulation der Expression unter anaeroben Bedingungen und nach Zugabe von Formiat. Eine Deletion von *hydH* und *hydG* bewirkt keine nennenswerte Reduktion der Expression, und auch eine Überexpression von

*hydG* zeigt keine Auswirkung. HydH und HydG sind also unter Wildtyp-Bedingungen nicht an der Expressionsaktivierung von *hycA* beteiligt.



**Abbildung 18:** Aktivierung einer *hycA*'-*lacZ* Reporterfusion in *hydG*- und *hydH*-Deletionstämmen. Zellen wurden in TGYEP-Medium unter aeroben oder anaeroben Bedingungen in Anwesenheit oder Abwesenheit von 30 mM Formiat kultiviert. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit jeweils drei Parallelen.

Parallele Versuche mit einer *fdhF*'-*lacZ*-Fusion in SA2/pBN205/pSECG ergaben, daß HydG<sub>EC</sub> die Expression von *fdhF* nicht über das Hintergrundniveau hinaus aktiviert.

Zusammenfassend machen diese Ergebnisse deutlich, daß HydG<sub>EC</sub> unter Wildtyp-Bedingungen nicht an der Regulation des FHL-Systems beteiligt ist. Sämtliche Aktivierungseffekte sind unspezifisch und nur bei Überexpression des Regulators zu erkennen.

### 1.5. Einfluß von HydG auf die Synthese und Aktivität des FHL-Komplexes

Das auf genetisch-molekularbiologischem Wege gefundene Ergebnis, daß HydG tatsächlich nicht an der Regulation des FHL-Systems beteiligt ist, sollte durch physiologische Versuche bestätigt werden. Deshalb wurde die Hydrogenase-Aktivität von Zellen mit deletiertem *hydG* im Vergleich zu der von Wildtyp-Zellen bestimmt. Die Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen in der Gegenwart von 15 mM Formiat angezogen, um eine optimale

Synthese des FHL-Systems zu gewährleisten. Danach wurde die Gesamtaktivität der Hydrogenasen als H<sub>2</sub>-Benzylviologen-Oxidoreduktase-Aktivität bestimmt. Wie die Aktivität von Extrakten aus  $\Delta hycE$ -Zellen zeigte (Tabelle 8), ist unter diesen Bedingungen der größte Teil der Hydrogenase-Aktivität auf das FHL-System zurückzuführen. Es zeigte sich, daß die spezifische Aktivität der Extrakte von *hydG*-Deletionsmutanten nicht verringert war im Vergleich zum Wildtyp. Dies ist ein zusätzlicher Beweis, daß HydG die Synthese des FHL-Systems nicht beeinflusst.

**Tabelle 8:** Einfluß von HydG auf die Gesamt-Hydrogenase-Aktivität. Für die Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität wurden Rohextrakte von anaerob kultivierten Zellen der verschiedenen Stämme eingesetzt.

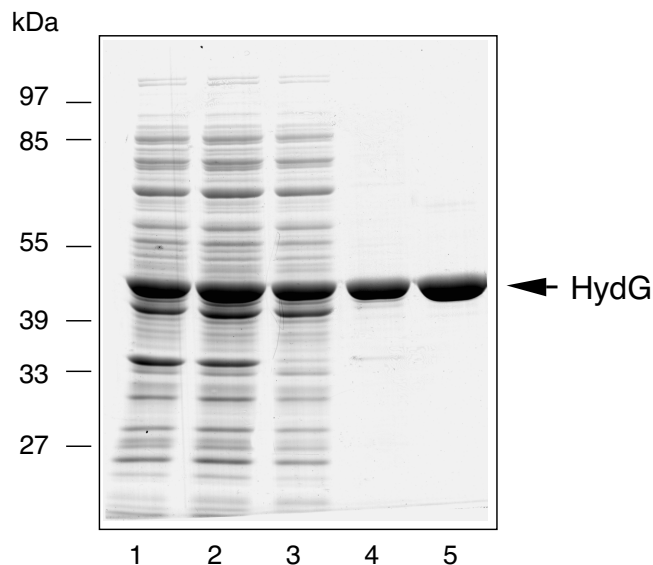
Stamm	Genotyp	Hydrogenase-Aktivität ( $\mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ )
MC4100	Wildtyp	4,54 $\pm$ 0,9
MC4100 $\Delta$ G	$\Delta hydG$	4,75 $\pm$ 1,0
HD705	$\Delta hycE$	0,13 $\pm$ 0,02

## 2. Reinigung und DNA-Bindung von HydG

### 2.1. Reinigung von HydG und Kristallisationsversuche

Nachdem die geschilderten *in vivo*-Versuche gezeigt hatten, daß das HydH/G-System nicht an der Regulation der Expression des FHL-Systems beteiligt ist, sollte seine wirkliche physiologische Funktion durch *in vitro*-Analysen mit gereinigtem HydG geklärt werden. Für die Reinigung von HydG als natives Protein wurde das Plasmid pHYDG, in dem *hydG* unter Kontrolle des T7-Polymerase-spezifischen  $\Phi 10$ -Promotors steht, in den Stamm BL21(DE3) eingebracht und HydG wurde überproduziert. Die Reinigung erfolgte im wesentlichen nach der von A. Huber entwickelten Prozedur (Huber, 1999), wobei jedoch einige wichtige Veränderungen vorgenommen wurden. Statt Chromatographie über eine Mono Q-Anionenaustauschersäule und anschließender Auftrennung über eine Superdex 75-Gelfiltrationssäule wurde die Proteinlösung nach Dialyse des gelösten Ammoniumsulfat-Präzipitates an einer Q Sepharose-Anionenaustauschersäule chromatographiert (siehe Material und Methoden). Auf diese Weise konnte die Ausbeute an gereinigtem Protein deutlich gesteigert werden: aus 14,7 g Zellnaßgewicht wurden etwa 22 mg HydG

aufgereinigt. Wie Abbildung 19 zeigt, war der Reinheitsgrad des erhaltenen Proteins hoch, obwohl die Reinigungsprozedur auf diese Weise verkürzt worden war.



**Abbildung 19:** Reinigung von HydG. Proben der verschiedenen Reinigungsschritte wurden analysiert durch 10 %ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung. 1: Rohextrakt; 2: Überstand der Zentrifugation bei 30000 g; 3: Überstand der Zentrifugation bei 100000 g; 4: 0-20 % Ammoniumsulfat-Fraktion; 5: gereinigtes HydG nach Q Sepharose-Anionenaustausch-Chromatographie.

Die Strukturanalyse eines Proteins mit unbekannter Funktion kann unter Umständen zum Verständnis des Reaktionsmechanismus und der spezifischen Eigenschaften des Proteins beitragen. Deshalb wurden von E. Fritsche in der Arbeitsgruppe R. Huber am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried Versuche unternommen, das gereinigte HydG zu kristallisieren, um durch Röntgenstrukturanalyse seine Struktur aufzulösen. Dabei ergab sich, daß HydG leicht in kristalliner Form zu erhalten ist, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von ATP im Kristallisationspuffer. Leider zeigten die HydG-Kristalle keine Streuung, weshalb eine weitere Untersuchung nicht möglich war (E. Fritsche, persönliche Mitteilung).

## 2.2. Bindung von HydG an die *hydH/G*-upstream-Region

Die Sequenzähnlichkeiten von HydG mit anderen Regulatorproteinen wie etwa NtrC umfassen auch den C-Terminus des Proteins, der ein mögliches DNA-Bindemotiv aufweist. Es ist also wahrscheinlich, daß HydG an DNA bindet, vermutlich an UAS-Sequenzen, die 5'



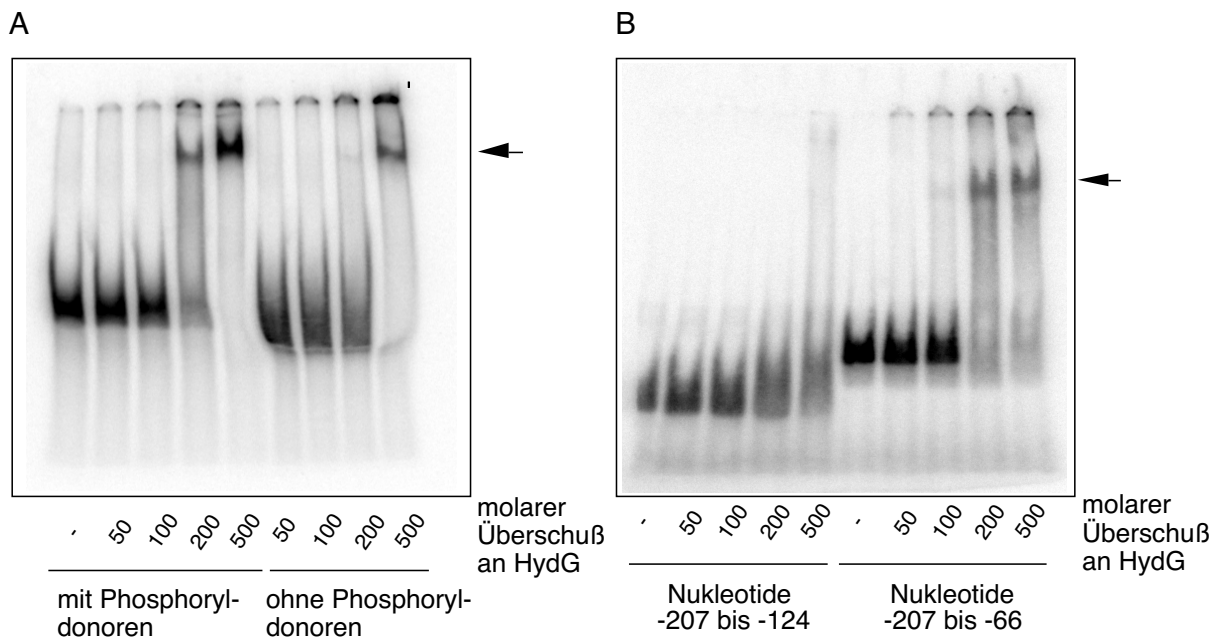
von den Genen liegen, die durch HydG reguliert werden. Viele Transkriptionsaktivatoren regulieren dabei zusätzlich zu ihren eigentlichen Zielgenen ihre eigene Expression. Diese Autoregulation erfolgt über den selben Mechanismus wie die Regulation der Zielgene, das bedeutet, daß hierfür ebenfalls DNA-Bindung erforderlich ist. Da Zielgene für HydG nicht bekannt waren, wurde zunächst untersucht, ob HydG an die *hydH*-upstream-Region bindet. Dies würde einerseits für eine Autoregulation sprechen, andererseits eine Charakterisierung einer HydG-Bindestelle möglich machen, die schließlich zu einer Identifizierung von HydG-Bindestellen vor anderen Genen und damit zur Entdeckung von Zielgenen beitragen könnte.

### 2.2.1. Gelretardationsexperimente

Die Bindung von HydG an DNA wurde zunächst durch Gelretardationsexperimente mit gereinigtem HydG untersucht. Dazu wurden verschiedene DNA-Fragmente, die unterschiedliche Bereiche der 5'-Region von *hydH* enthalten, durch PCR mit genomischer DNA aus MC4100 amplifiziert. Unter Verwendung der Oligonukleotide HydHup1 und HydHup2 entstand ein 199 bp langes Fragment, das den Bereich von -264 bis -66 relativ zum Startcodon von *hydH* umfaßt. Das DNA-Fragment wurde radioaktiv markiert und mit steigenden Mengen an gereinigtem HydG inkubiert. Anschließend wurde das Laufverhalten der DNA in einem nicht-denaturierenden Gel analysiert (Abbildung 20 A). Tatsächlich bindet HydG das markierte DNA-Fragment, wie das verzögerte Laufverhalten zeigt. In einigen Fällen wurde den Ansätzen Carbamoylphosphat und Acetylphosphat zugesetzt. Diese niedermolekularen Phosphorylgruppendonoren sind in der Lage, manche Regulatorproteine *in vitro* zu phosphorylieren und die Aktivierung der Proteine zu bewirken, indem sie die Übertragung der Phosphatgruppe vom Sensorprotein auf den Aspartatrest des Regulators imitieren (Lukat *et al.*, 1992; McCleary und Stock, 1994). Wie Abbildung 20 A zeigt, ist die DNA-Bindung von HydG in Anwesenheit der Phosphorylgruppendonoren um etwa einen Faktor 2,5 besser. Dies deutet darauf hin, daß HydG tatsächlich durch Phosphorylierung aktiviert wird, in gleicher Weise wie Regulatorproteine anderer Zwei-Komponenten-Systeme.

Um den Bereich, der von HydG gebunden wird, näher einzugrenzen und gleichzeitig auszuschließen, daß die Bindung unspezifisch auch in Abwesenheit einer Bindestelle erfolgt, wurden weitere DNA-Fragmente hergestellt. Die Verwendung der Oligonukleotide HydHup1 und HydHup4 in der PCR führte zur Amplifikation des Bereichs -264 bis -187 relativ zum *hydH* Startcodon, welcher im Gelretardationsexperiment nicht von HydG gebunden wurde, ebenso wie ein 87 bp langes Fragment des *fhIA* Strukturgens, das als Kontrolle diente (Daten nicht gezeigt). Die Bindung war also auf die Anwesenheit spezifischer Sequenzen zurückzuführen und erfolgte nicht mit beliebigen DNA-Fragmenten. Der Bereich -207 bis -66

(HydHup3-HydHup2) wurde in gleicher Weise wie -264 bis -66 durch HydG gebunden, das Fragment -207 bis -124 (HydHup3-HydHup6) dagegen nur sehr schwach (Abbildung 20 B).



**Abbildung 20:** Bindung von HydG an die *hydH*-upstream-Region. A. Ein die Basenpaare -264 bis -66 in Relation zum Startcodon von *hydH* umfassendes DNA-Fragment wurde mit steigenden Mengen an gereinigtem HydG inkubiert. Acetylphosphat und Carbamoylphosphat wurden dem Ansatz zugesetzt, wo angegeben. B. Die Basen -207 bis -66, bzw. -207 bis -124 enthaltende Fragmente wurden mit HydG in Anwesenheit von Acetylphosphat und Carbamoylphosphat inkubiert. Nach der Elektrophorese wurden die markierten DNA-Fragmente im Phosphoimager analysiert. Die Pfeile kennzeichnen die gebundene DNA.

Derselbe Versuchsansatz wurde auch dazu verwendet, die Aktivierung der Expression von *hycA* durch HydG genauer zu beleuchten. DNA-Fragmente aus dem 5'-Bereich von *hycA* (Basenpaare -215 bis -2 und Basenpaare -450 bis -152 relativ zum Startcodon von *hycA*) wurden unter den Bedingungen, die eine Bindung von HydG an die 5'-Sequenz von *hydH* zulassen, durch HydG nicht gebunden (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß die Aktivierung der Expression von *hycA* durch HydG unspezifisch ist.

### 2.2.2. DNase I Footprinting-Analyse der *hydH/G*-upstream-Region

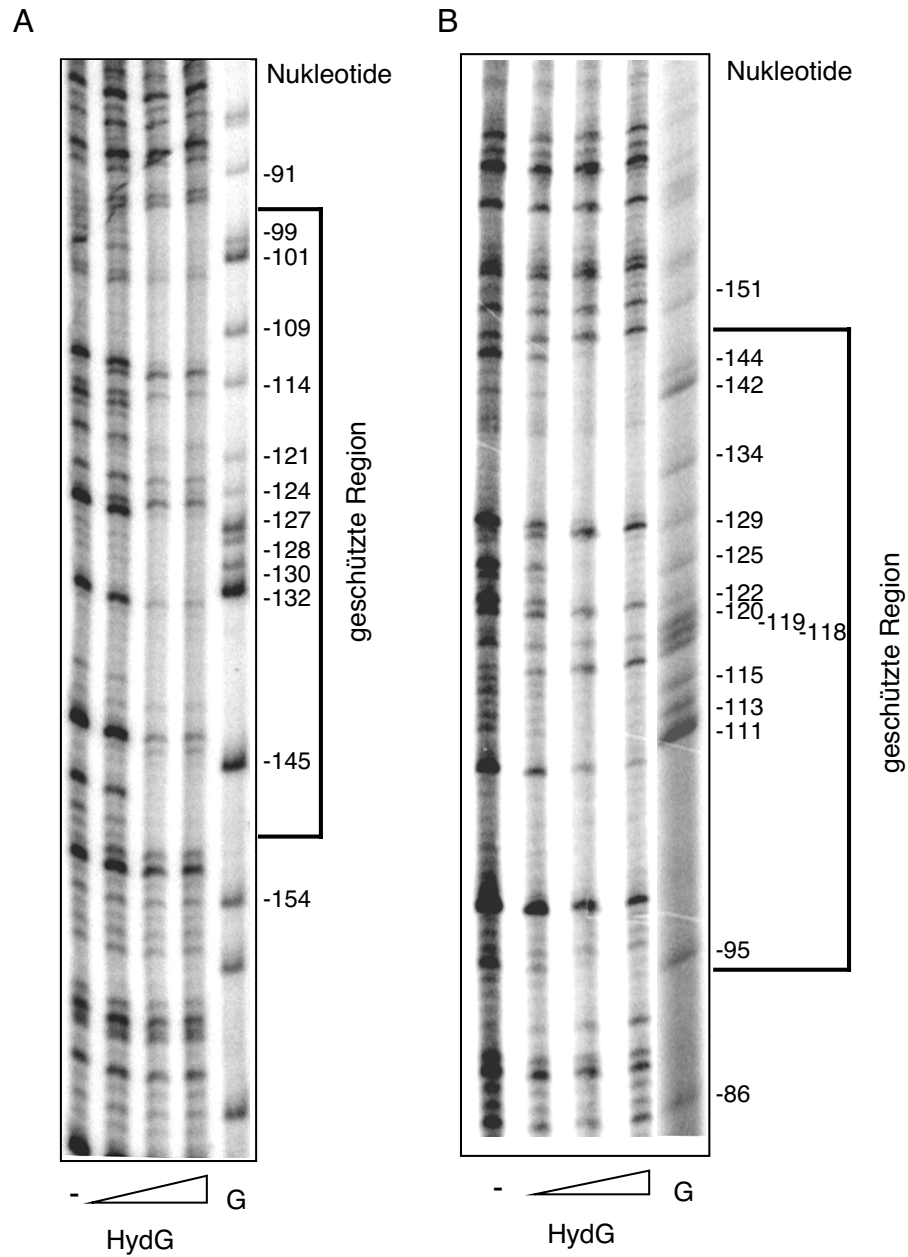
Aus den Daten der Gelretardationsexperimente läßt sich ableiten, daß der von HydG gebundene Bereich innerhalb der Region -207 bis -66 in Relation zum Startcodon von *hydH* liegt. Zur genaueren Bestimmung der HydG-Bindestelle wurde eine DNase I Footprinting-

Analyse der *hydH*-upstream-Region durchgeführt, um mit dieser Methode den von HydG gebundenen DNA-Bereich direkt nachzuweisen.

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde der Bereich von -232 bis -19 relativ zum Startcodon von *hydH* kloniert (pUHupA und pUHupB), in zwei Chargen isoliert und jeweils an einem Ende nur eines Stranges mit radioaktiven Nukleotiden markiert, so daß in einem Fall der kodierende, im anderen der nicht-kodierende Strang markiert wurde. Mit den so markierten Fragmenten und gereinigtem HydG wurde nun die DNase I Footprinting-Reaktion durchgeführt. Zusätzlich wurden die gleichen DNA-Fragmente bezüglich der G-Basen nach der Methode von Maxam und Gilbert (1977) sequenziert, um die geschützten Bereiche zuordnen zu können. Schließlich wurden alle Reaktionsansätze auf einem denaturierendem Gel aufgetrennt und mit einem Phosphorscreen analysiert. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, umfaßt der durch die Bindung von HydG vor Abbau durch DNase I geschützte Bereich im nicht-kodierenden Strang die Nukleotide -95 bis -150 relativ zum Startcodon von *hydH*, im kodierenden Strang den Bereich von -149 bis etwa -95.

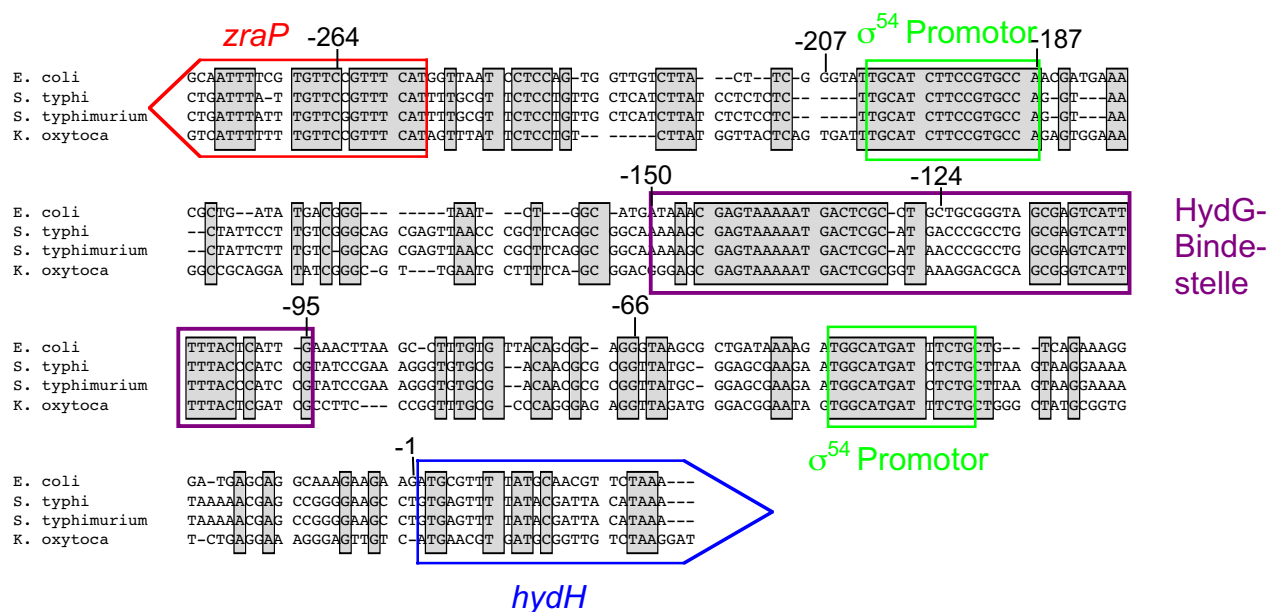
### 2.2.3. Untersuchung der *hydH*/G-upstream-Region

Nachdem durch Gelretardationsexperimente und DNase I Footprinting-Analysen der durch HydG gebundene Bereich auf eine 55 bp lange Region, etwa -150 bis -95 bp vom Translationsstart von *hydH* gelegen, eingegrenzt werden konnte, schloß sich die genauere Analyse dieser Sequenz und ihrer weiteren Umgebung an (Abbildung 22). Auffällig sind in dieser HydG-Bindestelle zwei jeweils 17 bp lange Stücke mit der Sequenz **GAGTAAAATGACTCGC**, die einmal auf dem kodierenden Strang, einmal in umgekehrter Richtung auf dem Gegenstrang liegen und durch eine 12 bp lange Zwischensequenz voneinander separiert sind. Diese inverted repeat-Sequenz weist ihrerseits wieder ein vier Basen langes Palindrom auf (fettgedruckt). Die Vermutung, daß es sich bei diesem prominenten Motiv um die eigentliche HydG-Bindestelle handelt, lag nahe, da auch bekannte Regulatorproteine oft Bindestellen haben, die ein inverted repeat-Motiv darstellen (Cannon *et al.*, 1990; Leonhartsberger *et al.*, 2000; Pérez-Martín und de Lorenzo, 1996b). Ein Vergleich der entsprechenden DNA-Sequenz mit derjenigen aus anderen Organismen wie *K. oxytoca*, *S. typhimurium* und *S. typhi* zeigt, daß diese beiden 17mere extrem konserviert sind, im Gegensatz zu der dazwischenliegenden Sequenz. Auch dies spricht für die Annahme, daß es sich dabei um die HydG-Bindestelle handelt. Ob nun die gesamte Region eine Bindestelle darstellt, oder zwei Bindestellen von jeweils 17 bp Länge, bleibt zu klären.



**Abbildung 21:** DNase I Footprinting-Analyse der Bindung von HydG an die *hydH/G*-upstream-Region. A: Für den nicht-kodierenden Strang erhaltenes Ergebnis. B: Ergebnis des kodierenden Stranges. A, B: Die linke Spur zeigt die Reaktion ohne HydG, die folgenden drei Spuren enthalten steigende Mengen an HydG (100-, 500- bzw. 2000-fach molarer Überschuß im Verhältnis zu DNA). In der rechten Spur sind die Fragmente der Maxam und Gilbert-Sequenzierung aufgetragen. Die Basen sind in Relation auf das *hydH*-Startcodon wie in Abbildung 22 nummeriert.

Wie in der Sequenz ebenfalls zu erkennen, befindet sich 5' vom Translationsstart von *hydH* ein Bereich, der aufgrund seiner hoher Übereinstimmung mit der -12/-24-Konsensussequenz ein  $\sigma^{54}$ -abhängiger Promotor sein könnte. Die Bindestelle von HydG befindet sich zwischen -127 und -72 zu dem von diesem putativen Promotor abgeleiteten Transkriptionsstart. Die meisten UAS von Transkriptionsaktivatoren (Reitzer und Magasanik, 1986; Schlenso *et al.*, 1994; Morett und Segovia, 1993 und darin zitierte Referenzen) liegen etwa bei -100 relativ zum Transkriptionsstart, eine Entfernung, die gut mit der hier dargelegten übereinstimmt. HydG könnte daher einer positiven Autoregulation unterliegen.



**Abbildung 22:** *zraP*-*hydH*-intergene Region in *E. coli*, *K. oxytoca*, *S. typhi* (Sequenzdaten wurden durch die "S. typhi Sequencing Group" am Sanger Centre produziert und können über [http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_typhi/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_typhi/) erhalten werden) und *S. typhimurium* (GenBank-Zugangsnummer AF170176). Die Anfänge der *hydH*- und *zraP*-Gene sind eingezeichnet ebenso wie die putativen -24/-12-Promotoren und die durch DNase I Footprinting in der *E. coli*-Sequenz bestimmte HydG-Bindestelle. Nukleotide sind nach der *E. coli*-Sequenz in Relation zum *hydH*-Startcodon nummeriert.

Die experimentelle Bestimmung der HydG-Bindestelle sollte eine Identifizierung von gleichen oder ähnlichen Sequenzen vor anderen Genen ermöglichen, die aus diesem Grund als potentielle Zielgene für die Regulation durch das HydH/G-Zwei-Komponenten-System in Frage kämen. Eine ausgedehnte Datenbankrecherche (BLAST, Colibri) sowohl mit der 55 bp-Bindesequenz als auch mit dem 17 bp-Motiv erbrachte jedoch überraschenderweise, daß dieses 17mer nur zweimal im gesamten Genom von *E. coli* vorkommt, eben in der 5'-Region von *hydH*. Auch geringfügig degenerierte Sequenzen konnten nicht vor anderen

Genen gefunden werden. Das bedeutet, daß entweder andere Bindestellen zu unähnlich sind, um auf diese Weise identifiziert zu werden, oder daß es tatsächlich keine anderen gibt. Deshalb, und auch weil Zielgene oft in der unmittelbaren Nähe der Gene ihrer Regulatoren liegen, wurde die Region um das *hydH/G*-Operon genauer untersucht. 5' von *hydH*, spiegelbildlich zur HydG-Bindestelle, konnte ein weiterer putativer -24/-12-Promotor gefunden werden, der vor einem 564 bp langen offenen Leserahmen liegt, welcher ursprünglich *yjaI* genannt wurde. Wie Noll *et al.* (1998) gezeigt haben, kodiert er für ein 20 kDa großes Protein, das prozessiert wird und dessen 12 kDa großes C-terminales Fragment schließlich im Periplasma vorliegt und mit Resistenz gegen hohe Zink-Konzentrationen assoziiert werden konnte. Das Gen wurde von diesen Autoren in *zraP* unbenannt, "für zinc resistance associated protein". Die Ähnlichkeit der Abstände zwischen der HydG-Bindestelle und den putativen Promotoren von *hydH* und *zraP* einerseits und zwischen den Promotoren und Translationsstartpunkten beider Gene andererseits ist so auffallend, daß sich die Frage aufdrängte, ob HydH/G der Regulator für *zraP* ist.

### 3. Aktivierung der Expression von *zraP* durch HydH/G

#### 3.1. Klonierung einer *zraP*'-*lacZ*-Genfusion

Die durch die Ergebnisse der HydG-DNA-Bindungsexperimente aufgeworfene Frage, ob das HydH/G-Zwei-Komponenten-System die Expression von *zraP* reguliert, sollte mittels *zraP*'-*lacZ*-Reportergen-Fusionen geklärt werden. Durch PCR mit den Oligonukleotiden *laczra1* und *laczra2* und genomischer DNA aus MC4100 als Matrize wurde ein 217 bp langes Fragment amplifiziert, das den *hydH-zraP*-intergenen Bereich bis einschließlich der ersten sechs Codonen von *zraP* umfaßt. Nach Schneiden der Enden mit *EcoRI* und *BamHI* an den durch die Oligonukleotide eingeführten Schnittstellen wurde das Fragment in den mit denselben Enzymen behandelten Vektor pRS552 ligiert. Das entstandene Plasmid pRzra enthält eine Genfusion zwischen den ersten sechs Codonen von *zraP* und dem *lacZ*-Gen.

Die Funktionalität der Fusion und die mögliche Abhängigkeit der Expression von HydG wurde im Vorversuch dadurch getestet, daß entsprechende Stämme mit dem Plasmid transformiert wurden und auf Platten mit X-Gal auf ihre Färbung, welche der Aktivität der gebildeten  $\beta$ -Galaktosidase entspricht, untersucht wurden. MC4100/pRzra/pSU2719 zeigte eine leichte Blaufärbung, die in MC4100 $\Delta$ G/pRzra/pSU2719 nicht zu sehen war. Wurde statt

der Vektorkontrolle pSU2719 das Plasmid pSECG verwendet, so zeigten beide Stämme eine intensivere Blaufärbung. Diese Ergebnisse weisen einerseits auf eine funktionelle Translationsfusion hin und zeigen andererseits eine Abhängigkeit der *zraP*-Expression von HydG. Nach diesen vielversprechenden Vorversuchen wurde die *zraP'*-*lacZ*-Fusion mittels  $\lambda$ -Phagen nach der Methode von Simons *et al.* (1987) in die  $\lambda$ -Attachment-Site verschiedener Stämme eingebracht, um die Expression der Fusion in einfacher Kopienzahl auf dem Chromosom untersuchen zu können.

### 3.2. Spezifität der Regulation von *zraP* durch HydH/G

Die Transkriptionsaktivierung von *zraP* durch HydH/G wurde durch Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität verschiedener Stämme mit der *zraP'*-*lacZ*-Fusion quantifiziert. Außerdem wurde im folgenden Experiment der Einfluß steigender  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen auf die Aktivierung der Expression von *zraP* durch HydG untersucht, da Noll *et al.* (1998) gezeigt hatten, daß die Menge an prozessiertem ZraP im Periplasma in Anwesenheit hoher  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen erhöht ist. Gleichzeitig wurde geprüft, ob sowohl HydG als auch HydH für die Aktivierung der Expression von *zraP* nötig sind.

Wie in Tabelle 9 zu sehen ist, ist die Expressionsaktivierung strikt abhängig von der Anwesenheit funktioneller *hydH*- und *hydG*-Gene. Anders als bei der unspezifischen Aktivierung von *hycA* wird hier also auch das Sensorprotein gebraucht; die Aktivierung erfolgt damit auf dem klassischen Weg. Im Wildtyp MCzra/pSU2719 ist die Aktivierung zudem abhängig von hohen  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen, wobei erst bei einer Konzentration von über 0,5 mM  $ZnCl_2$  eine über den Hintergrund gesteigerte Expression zu messen ist. Die *hydG*-Deletionsmutante kann durch Plasmid-kodiertes HydG komplementiert werden (MC $\Delta$ Gzra/pSECG); hier ist die Expression von *zraP* in allen Fällen höher, was vermutlich auf eine höhere Expression von *hydG* selbst zurückzuführen ist. Da in diesem Stamm *hydG* konstitutiv exprimiert wird, erfolgt *zraP*-Expression sogar in Abwesenheit von Zink. Dies kann als ein Hinweis auf eine Zink-induzierte Autoregulation von HydH/G interpretiert werden.

**Tabelle 9:** Aktivierung der Expression einer chromosomal lokalisierten *zraP'*-*lacZ*-Fusion durch das HydH/G-Zwei-Komponenten-System in Abhängigkeit von  $ZnCl_2$ . Die Zellen wurden in LB-Medium mit 0,4 % Glucose und verschiedenen Konzentrationen an  $ZnCl_2$  unter aeroben Bedingungen angezogen. Die Werte sind  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in Miller-Units als Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, die in drei Parallelen durchgeführt wurden, außer \*: Ergebnisse eines typischen Experimentes.

	<b>0 mM <math>ZnCl_2</math></b>	<b>0,05mM <math>ZnCl_2</math></b>	<b>0,2 mM <math>ZnCl_2</math></b>	<b>0,5 mM <math>ZnCl_2</math></b>	<b>1 mM <math>ZnCl_2</math></b>
<b>MCzra/pSU2719</b>	4	6	17	80	1052
<b>MC<math>\Delta</math>Gzra/pSU2719</b>	4*	7*	8*	6*	8*
<b>MC<math>\Delta</math>Hzra/pSU2719</b>	8*	15*	11*	16*	6*
<b>MC<math>\Delta</math>Gzra/pSECG</b>	778	781	1095	1392	3812

Um endgültig auszuschließen, daß die Aktivierung von *zraP* durch HydG wie im Fall von *hycA* ein unspezifisches Phänomen ist, wurde der Effekt von HydG auf die Expression von einigen anderen Promotoren untersucht, darunter Promotoren aus *E. coli* und anderen Mikroorganismen. Es stellt sich heraus, daß alle diese getesteten Promotoren durch HydG nicht aktiviert wurden. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die Aktivierung von *zraP* durch HydG in der Tat spezifisch ist.

### 3.3. Zink und Blei als Induktoren der Expression von *zraP*

Nachdem der Beweis erbracht war, daß  $ZnCl_2$  die Aktivierung der Expression von *zraP* durch HydG fördert, stellt sich die Frage, ob dieser Effekt spezifisch auf Zink zurückzuführen ist, oder ob auch andere Metalle oder Schwermetallstress allgemein als Induktoren wirken können. Zu diesem Zweck wurde die Expression der *zraP'*-*lacZ*-Fusion in Gegenwart von verschiedenen Metallchloriden quantifiziert, die jeweils in einer nahe der minimalen Hemmkonzentration liegenden Konzentration zugegeben wurden. Wie den Werten aus Tabelle 10 zu entnehmen ist, führt außer  $ZnCl_2$  nur  $PbCl_2$  zu einer nennenswerten Aktivierung des Systems, jedoch auch in einem im Vergleich zu  $ZnCl_2$  reduziertem Maße. Der Effekt von  $CdCl_2$  liegt ebenfalls über dem Hintergrund, die Aktivität beträgt aber nur 3 % der in Anwesenheit von  $ZnCl_2$  gemessenen.



**Tabelle 10:** Spezifität der Induktion der Expression der *zraP'*-*lacZ*-Fusion durch Zink- und Blei-Ionen. MCzra (*zraP'*-*lacZ*) wurde in LB-Medium mit 0,4 % Glucose und verschiedenen Metallen unter aeroben Bedingungen angezogen. NiCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub> und ZnCl<sub>2</sub> wurden in einer Konzentration von 1 mM zugegeben, CuCl<sub>2</sub> und CdCl<sub>2</sub> ad 0,5 mM und HgCl<sub>2</sub> ad 1 µM. -: kein Metall zugegeben. Die Werte sind β-Galaktosidase-Aktivitäten in Miller-Units als Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, die in drei Parallelen durchgeführt wurden.

-	CuCl <sub>2</sub>	NiCl <sub>2</sub>	CoCl <sub>2</sub>	MnCl <sub>2</sub>	FeCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	HgCl <sub>2</sub>	CdCl <sub>2</sub>	PbCl <sub>2</sub>	ZnCl <sub>2</sub>
5	2	9	1	7	10	6	11	56	732	1700

### 3.4. Abhängigkeit der Expressionsaktivierung von *zraP* vom alternativen Sigmafaktor $\sigma^{54}$

Die hohe Ähnlichkeit von HydH/G zu NtrB/C einerseits und die Lokalisierung eines putativen  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotors sowohl vor *hydHG* als auch vor *zraP* andererseits werfen die Frage auf, ob das HydH/G-Zwei-Komponenten-System tatsächlich  $\sigma^{54}$ -abhängig ist. Zur Untersuchung dieser Frage wurde der Stamm BN450zra konstruiert, indem die *zraP'*-*lacZ*-Fusion in den *ntrA*-Deletionsstamm BN450 transduziert wurde. Der erhaltene Stamm wurde unter aeroben Bedingungen in LB-Medium, das mit 0,4 % Glucose supplementiert war, angezogen und die β-Galaktosidase-Aktivität der Zellen wurde in Gegenwart und Abwesenheit von 1 mM ZnCl<sub>2</sub> bestimmt. Ohne Zink wurde eine β-Galaktosidase-Aktivität von 10 Miller-Units, in Gegenwart von Zink 11 Miller-Units gemessen. Das bedeutet, daß ohne  $\sigma^{54}$  trotz Anwesenheit des Induktors und der Gene für das Zwei-Komponenten-System praktisch keine Expression von *zraP* erfolgt. Ob dies durch eine  $\sigma^{54}$ -Abhängigkeit der Expression von *zraP* direkt oder von *hydHG* oder von beiden Transkriptionseinheiten bewirkt wird, müssen weitere Versuche zeigen.

### 3.5. Anaerobe Expression von *zraP*

Alle Versuche zur *zraP*-Expression waren bis zu diesem Zeitpunkt unter aeroben Bedingungen durchgeführt worden. Da die unspezifische Aktivierung der *hycA'*-*lacZ*-Fusion durch HydG jedoch eine deutliche Abhängigkeit von anaeroben Bedingungen gezeigt hatte, sollte überprüft werden, ob auch die *zraP*-Expressionsaktivierung durch HydG im Anaeroben

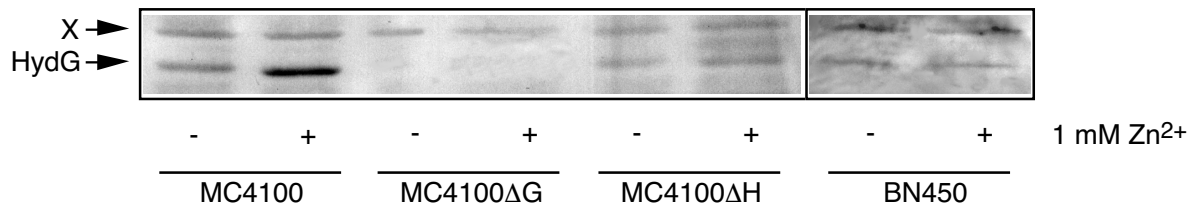
gesteigert ist. MCzra wurde jeweils aerob und anaerob bei 37 °C angezogen. Als Medium wurde mit 0,4 % Glucose supplementiertes LB-Medium verwendet, welches mit 100 mM MOPS (pH 6,5) gepuffert wurde, um den pH-Wert unter anaeroben wie aeroben Bedingungen konstant zu halten. Phosphat-gepuffertes Medium konnte wegen der hohen  $\text{ZnCl}_2$ -Konzentration nicht eingesetzt werden. Bei Zugabe von 1 mM  $\text{ZnCl}_2$  wurden unter aeroben Bedingungen 1264, unter anaeroben 1258 Miller-Units gemessen. Ohne Zugabe von  $\text{ZnCl}_2$  war unter keiner Bedingung meßbare Expression zu verzeichnen. Das zeigt, daß die HydG-vermittelte Expression von *zraP* unabhängig von der Sauerstoffversorgung der Zellen erfolgt.

#### 4. Regulation von *hydH/G*

Durch DNase I Footprinting war gezeigt worden, daß sich die Bindestelle von HydG in der *zraP-hydH*-intergenen Region befindet, in etwa gleicher Entfernung von beiden Genen. Wie Untersuchungen mit *zraP'-lacZ*-Genfusionen ergeben haben, wird die Expression von *zraP* durch HydG in Gegenwart hoher Zink-Konzentrationen aktiviert. Sehr interessant war nun die Frage, ob das an diese Bindestelle gebundene HydG auch in die andere Richtung wirkt, das heißt, ob die Expression von *hydH/G* einer Autoregulation unterworfen ist. Da Antikörper, die gegen das gereinigte HydG-Protein gerichtet sind, zur Verfügung standen, konnte diese Fragestellung auf Proteinebene mittels Immunoblots untersucht werden.

##### 4.1. Autoregulation von *hydH/G*

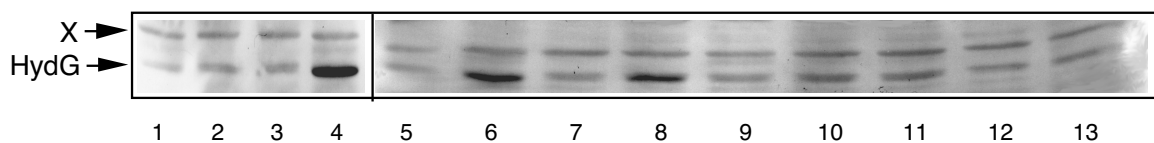
Zur Analyse der Regulation von *hydG* wurde der Gehalt an HydG in Zellen, die in Gegenwart und Anwesenheit von  $\text{ZnCl}_2$  kultiviert worden waren, durch Immunoblot bestimmt (Abbildung 23). Der Wildtypstamm MC4100 bildet auch in Abwesenheit von Zink eine geringe Menge an HydG-Protein, die in Gegenwart von 1 mM  $\text{ZnCl}_2$  deutlich gesteigert ist. Tatsächlich ist also die Expression von *hydG* wie die von *zraP* Zink-abhängig. In MC4100ΔG ist unter beiden Bedingungen kein HydG zu erkennen, was auf die funktionelle Deletion des Gens zurückzuführen ist. Die Menge an HydG in MC4100ΔH ist mit und ohne Zink-Supplementation gleich und entspricht etwa der Wildtyp-Situation unter nicht-induzierenden Bedingungen. Die Induktion der Synthese von HydG ist also abhängig von HydH. Diese Ergebnisse zeigen, daß das HydH/G-System einer positiven Autoregulation unterliegt, wobei Zink als Effektor wirkt.



**Abbildung 23:** Regulation der Expression von *hydH/G*. Zellen wurden kultiviert in LB-Medium mit 0,4 % Glucose mit oder ohne 1 mM ZnCl<sub>2</sub>. SDS-Lysate der in der exponentiellen Phase geernteten Zellen wurden durch SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und durch Immunoblot mit anti-HydG-Antikörpern analysiert. X zeigt eine unspezifische Kreuzreaktion der Antikörper.

#### 4.2. Induktion durch verschiedene Metalle

Die Analyse der Autoregulation von HydH/G bot einen ausgezeichneten experimentellen Ansatz, um die Expression von *hydH/G* genauer zu beleuchten. So wurde die Auswirkung von verschiedenen Metallchloriden auf die Expressionsinduktion untersucht. Wie Abbildung 24 zeigt, ist von allen getesteten Metallen neben ZnCl<sub>2</sub> nur PbCl<sub>2</sub> als Induktor wirksam. Die Metallspezifität der Regulation von *hydH/G* ist also identisch zu der Spezifität der Regulation von *zraP*.



**Abbildung 24:** Stimulation der Expression von *hydH/G* durch Metallionen. SDS-Lysate von MC4100, kultiviert in LB-Medium mit 0,4 % Glucose und verschiedenen Metallchloriden, wurden auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Immunoblot mit anti-HydG-Antikörpern analysiert. Folgende Metalle waren dem Medium zugesetzt: 1: 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 2: 1 μM HgCl<sub>2</sub>; 3 und 5: kein Metall; 4 und 6: 1 mM ZnCl<sub>2</sub>; 7: 0,5 mM CdCl<sub>2</sub>; 8: 1 mM PbCl<sub>2</sub>; 9: 1 mM NiCl<sub>2</sub>; 10: 1 mM MnCl<sub>2</sub>; 11: 0,5 mM CuCl<sub>2</sub>; 11: 1 mM CoCl<sub>2</sub>; 13: 1 mM FeCl<sub>2</sub>. X zeigt eine unspezifische Kreuzreaktion der Antikörper.

### 4.3. $\sigma^{54}$ -Abhängigkeit der *hydH/G*-Expression

Es war gezeigt worden, daß die Expression von *zraP* abhängig von  $\sigma^{54}$  ist. Da sich sowohl vor *zraP* als auch vor *hydHG* Sequenzen befinden, die hohe Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz eines  $\sigma^{54}$ -Promotor zeigen, war jedoch nicht klar, ob diese Abhängigkeit die *zraP*-Transkription direkt betrifft oder durch eine  $\sigma^{54}$ -Abhängigkeit der Expression des HydH/G-Systems zu erklären ist. Daher wurde der Stamm BN450 ( $\Delta ntrA$ ) in Gegenwart und Abwesenheit von Zink angezogen und auf seinen HydG-Gehalt hin untersucht. Es stellte sich heraus, daß ähnlich wie bei MC4100 $\Delta$ H die Expression von HydG unter beiden Bedingungen gleich stark ist, das heißt, es findet keine Autoinduktion mehr statt (Abbildung 23). *hydH/G* wird also tatsächlich  $\sigma^{54}$ -abhängig transkribiert, höchstwahrscheinlich vom oben erwähnten putativen -24/-12-Promotor aus. Da der HydG-Gehalt in BN450 jedoch nicht auf Null absinkt wie in MC4100 $\Delta$ G, muß davon ausgegangen werden, daß zusätzlich zu diesem  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotor noch ein konstitutiver Promotor vorliegt.

## 5. Untersuchungen zur physiologischen Rolle des HydH/G-Zwei-Komponenten-Systems

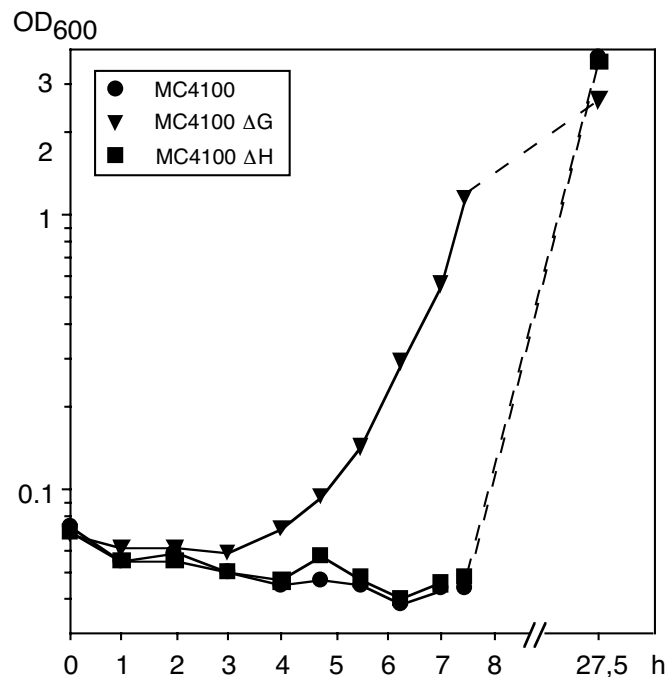
### 5.1. Einfluß von HydH/G auf die Zink-Toleranz der Zellen

Noll *et al.* (1998) hatten *zraP* im Zusammenhang mit Toleranz der Zellen gegen hohe  $ZnCl_2$ -Konzentrationen beschrieben und in der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß die HydG-abhängige Expression von *zraP* vor allem in Gegenwart von hohen  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen induziert ist. Daher lag der Schluß nahe, daß das HydH/G-System ein Regulationssystem darstellt, das den Zellen Toleranz gegen hohe  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen verleiht. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von  $ZnCl_2$  gegenüber verschiedener Stämme sollte darüber Aufschluß geben. MC4100, MC4100 $\Delta$ G, MC4100 $\Delta$ H und BN450 wurden unter aeroben Bedingungen in LB-Medium in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an  $ZnCl_2$  angezogen, und die MHK wurde bestimmt. Es ergab sich für alle vier Stämme ein Wert von 2,5 mM  $ZnCl_2$ . Das bedeutet, daß unter den gewählten Bedingungen HydH/G zumindest keinen großen Einfluß auf die Zink-Toleranz der Zellen hat, da die Stämme, die eine Deletion in den Genen *hydH* oder *hydG* haben, in Gegenwart gleich hoher  $ZnCl_2$ -Konzentrationen wachsen wie der Wildtyp. Gleichzeitig legen die Ergebnisse nahe, daß unter diesen Bedingungen auch ZraP die Zink-Toleranz nicht beeinflusst, da in MC4100 $\Delta$ G, MC4100 $\Delta$ H und BN450 *zraP* nicht exprimiert wird, wie in Kapitel C 3. gezeigt werden konnte.

## 5.2. Einfluß von HydH/G auf das Zellwachstum

Da HydH und HydG keinen meßbaren Einfluß auf die Zink-Toleranz der Zellen haben, wurde untersucht, ob die Deletionsmutanten Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp zeigen. In Abwesenheit von Zink war das Wachstumverhalten der Deletionsstämme sowohl in LB-Medium unter aeroben Bedingungen als auch in mit 0,5 % Glucose supplementiertem Werkmann-Minimalmedium unter aeroben wie anaeroben Bedingungen unverändert im Vergleich zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Für Wachstumsversuche in Anwesenheit von  $\text{ZnCl}_2$  wurden die Stämme MC4100, MC4100 $\Delta$ G und MC4100 $\Delta$ H in LB-Medium, das mit 0,4 % Glucose und 1 mM  $\text{ZnCl}_2$  supplementiert war, bei 37 °C kultiviert. Um absolut vergleichbare Voraussetzungen zu schaffen, wurden die Zellen durch wiederholtes Überimpfen so lange kultiviert, bis die drei Kulturen in der gleichen Wachstumsphase waren. Ausgehend von diesen Kulturen wurde jeweils aus der logarithmischen, früh-stationären und spät-stationären Wachstumsphase der Wachstumsversuch gestartet. In allen drei Fällen zeigten Wildtyp und Deletionsmutanten eine gleiche Wachstumsrate nach vergleichbaren lag-Phasen (Daten nicht gezeigt).

Nachdem HydH/G keinen erkennbaren Einfluß auf das "steady-state"-Wachstum zeigte, wurde untersucht, wie sich Wildtyp und Deletionsstämme bei einem Wechsel aus Zink-freiem in Zink-haltiges Medium verhalten. MC4100, MC4100 $\Delta$ G und MC4100 $\Delta$ H wurden in der exponentiellen Wachstumsphase aus Vollmedium ohne zugesetztes Zink in das gleiche Medium mit 1 mM  $\text{ZnCl}_2$  überimpft (Abbildung 25). Dieser Wechsel hatte extrem lange lag-Phasen zur Folge, wobei MC4100 $\Delta$ G nach etwa 4 h wieder in exponentielles Wachstum überging, MC4100 $\Delta$ H und MC4100 aber erst nach mehr als 8 h (Zeitpunkt nicht bestimmt). Obwohl in Zink-haltigem Medium offensichtlich einige auf HydG zurückzuführende Wachstumsunterschiede erkennbar sind, sind diese zum gegenwärtigen Zeitpunkt schwer interpretierbar und konnten die Theorie, daß HydH/G Zink-Toleranz oder ein besseres Wachstum in Gegenwart hoher Zink-Konzentrationen vermittelt, nicht bestätigen.



**Abbildung 25:** Einfluß von HydH/G auf das Zellwachstum nach Zugabe von 1 mM ZnCl<sub>2</sub>. MC4100, MC4100ΔG und MC4100ΔH wurden in der exponentiellen Wachstumsphase aus LB-Medium, das mit 0,4 % Glucose supplementiert war, in das gleiche Medium mit 1 mM ZnCl<sub>2</sub> überimpft. Dargestellt ist das Zellwachstum als Zunahme der OD<sub>600</sub> nach verschiedenen Zeitpunkten nach dem Mediumwechsel.

### 5.3. Zeitlicher Verlauf der Induktion der HydG-abhängigen *zraP*-Expression durch Zink

Da aus den Wachstumsversuchen zu entnehmen war, daß die Zellen nach plötzlicher Zugabe hoher Zink-Konzentrationen das Wachstum für einen Zeitraum von mehreren Stunden einstellen, war die Frage interessant, ob während dieser Zeit bereits eine Induktion der Expression von *zraP* durch HydG stattfindet. Nach Zugabe von ZnCl<sub>2</sub> bis zu einer Konzentration von 1 mM während der exponentiellen Phase wurde die Induktion der *zraP*-Expression durch Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität verfolgt (Tabelle 11). Die *zraP*-Expression nimmt etwa 30 min nach Zugabe von ZnCl<sub>2</sub> zu, jedoch nur sehr langsam. Selbst nach Inkubation der Kultur über Nacht bleibt die Expression unter dem Niveau, das sich bei kontinuierlicher Anzucht in Medium mit 1 mM ZnCl<sub>2</sub> ergibt. Daraus ist abzuleiten, daß HydH/G kein Regulationssystem ist, das schnell auf eine Zunahme der Zink-Konzentration reagiert und daß die durch HydH/G bewirkte *zraP*-Induktion zumindest an einer schnellen Adaptation an hohe Zink-Konzentrationen nicht beteiligt ist.

**Tabelle 11:** Zeitlicher Verlauf der Induktion der HydG-abhängigen *zraP*-Expression durch Zink. Die Zellen wurden in LB-Medium mit 0,4 % Glucose unter aeroben Bedingungen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2 bis 0,3 kultiviert. Daraufhin wurde 1 mM ZnCl<sub>2</sub> zugegeben und nach verschiedenen Zeitpunkten (üN: über Nacht) die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Zellen in Miller-Units bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, die in drei Parallelen durchgeführt wurden.

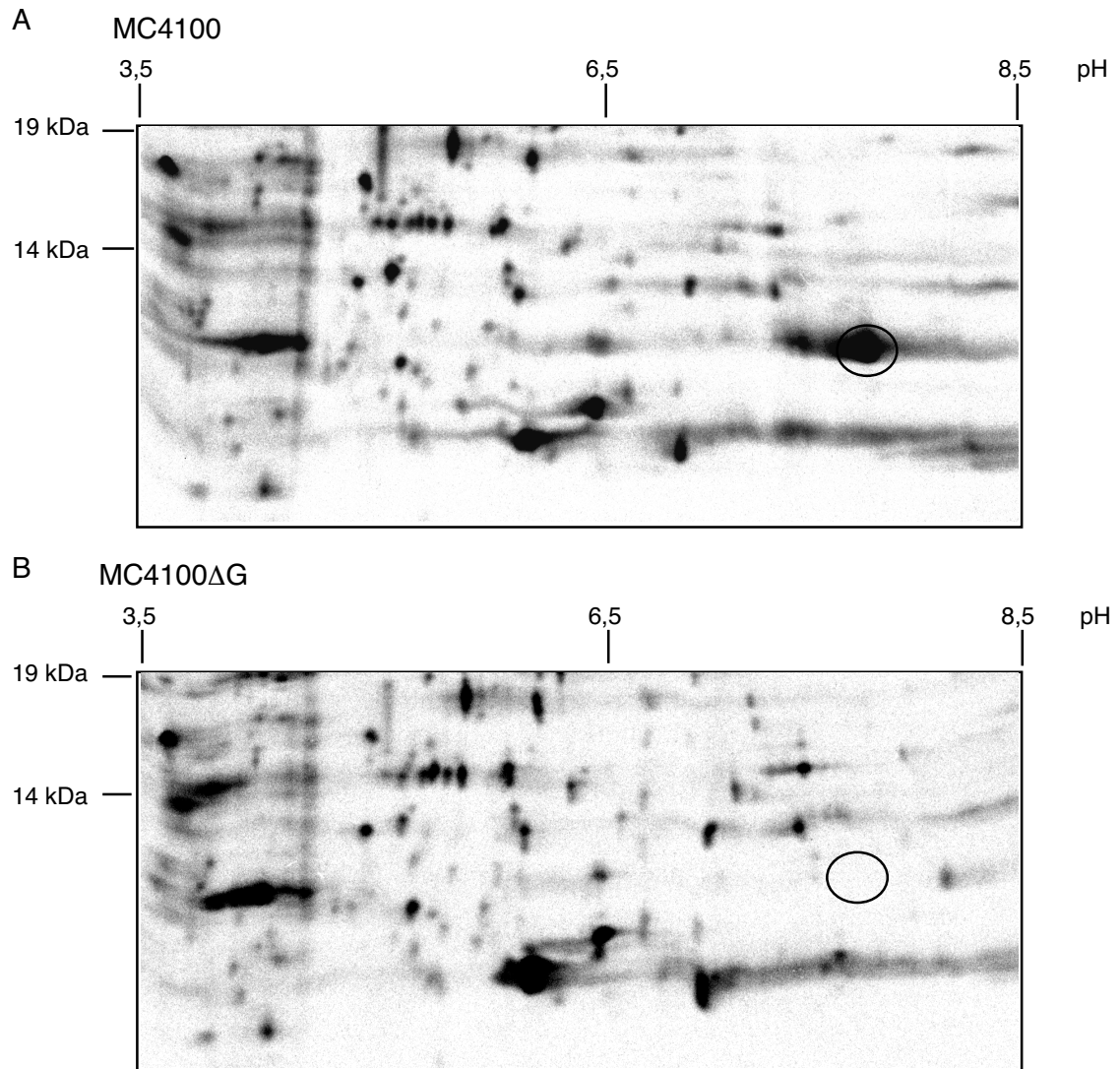
	0 min	10 min	30 min	60 min	180 min	üN
<b>MCzra</b>	14	12	19	35	84	343
<b>MC<math>\Delta</math>Gzra</b>	9	5	7	6	6	1

#### 5.4. Identifizierung von Proteinen, deren zelluläre Konzentration durch HydG beeinflusst wird, mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

Der Vergleich des Proteinmusters in der Zelle unter verschiedenen Bedingungen mittels zweidimensionaler (2D-) Gelelektrophorese sollte Aufschluß darüber geben, welche Proteine in ihrer zellulären Konzentration durch HydG positiv oder negativ beeinflusst werden. Auf diese Weise sollten mögliche weitere Zielgene von HydG identifiziert werden, um die physiologische Rolle von HydG zu durchleuchten.

Zellen des Wildtyps MC4100 und der *hydG*-Deletionsmutante MC4100 $\Delta$ G wurden in Gegenwart von 1mM ZnCl<sub>2</sub> angezogen und mit einer Mischung aus <sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein radioaktiv markiert. Nach dem Aufbruch wurden die Proteine einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen.

Der Vergleich der in der ersten Dimension von pH 3 bis 10 (nicht-linearer Gradient) und in der zweiten Dimension in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine zeigt einen sehr deutlichen Unterschied, der sowohl im silbergefärbten Gel als auch im Autoradiogramm zu erkennen ist (Abbildung 26). Bei MC4100 ist im Bereich von etwa 12 kDa, bei einem pH von ungefähr 7,5 ein sehr prominentes, nicht scharf fokussiertes Signal zu erkennen, das in der Deletionsmutante an der entsprechenden Stelle völlig fehlt. Dieses Protein entspricht mit hoher Wahrscheinlichkeit dem 12 kDa großen, C-terminalen Fragment von ZraP, welches einen rechnerischen pI von 7,5 besitzt. Dieses Ergebnis ist also auch auf Proteinebene ein sehr starker Hinweis darauf, daß die Expression von *zraP* abhängig von HydG ist.

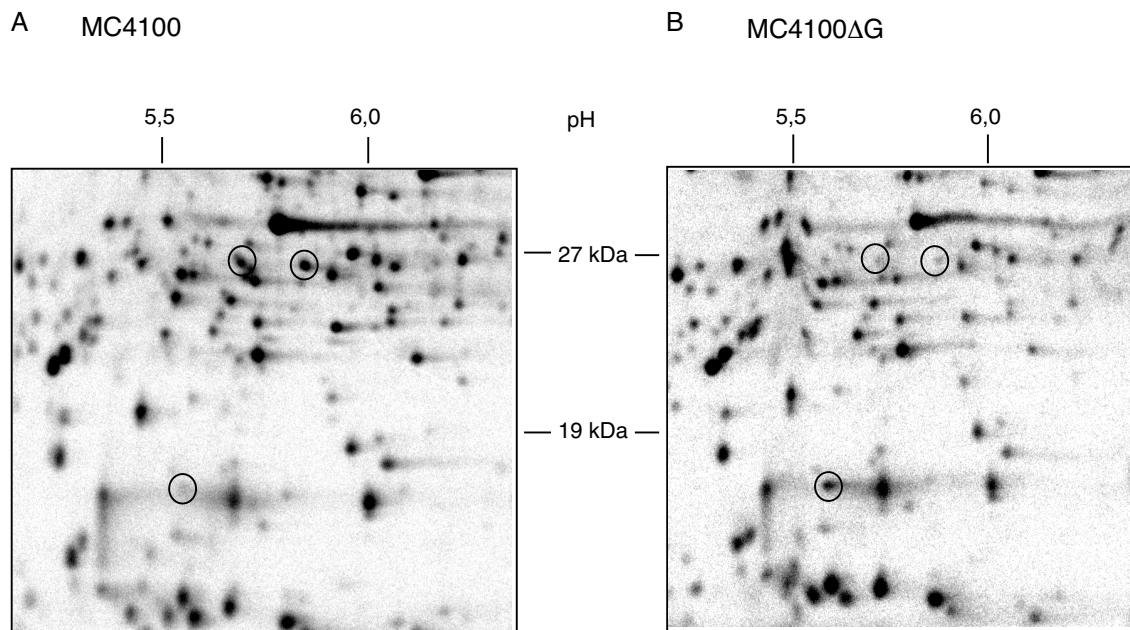


**Abbildung 26:** HydG-abhängige Produktion eines 12 kDa großen Proteins mit pI 7,5 (ZraP?). Ausschnitt aus Autoradiogrammen repräsentativer 2D-Gele (Durchführung in drei Parallelen). MC4100 (A) und MC4100ΔG (B) wurden in MOPS-Minimalmedium in Gegenwart von 1 mM  $ZnCl_2$  angezogen und mit  $^{35}S$  markiert. Die Auftrennung der Zellextrakte erfolgte in erster Dimension von pH 3 bis 10 (nicht-linearer Gradient), in zweiter Dimension in 15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen. Der Kreis markiert das selektiv produzierte Protein.

Die Verwendung eines linearen pH-Gradienten von 4 bis 7 und eines 12,5 %igen Gels in der zweiten Dimension eignete sich zur effektiven Auftrennung des Großteils der Zellproteine. Ein Vergleich zweier Chargen von Gelen zeigte vier reproduzierbare Unterschiede. Ein Protein von etwa 53 kDa Größe und einem pI von ca. 5,3 war nur im Extrakt von MC4100 vorhanden (Daten nicht gezeigt). Dabei könnte es sich um HydG (theoretische Daten: 48,5 kDa, pI 5,28) handeln, dessen Synthese in Gegenwart von  $ZnCl_2$  im Wildtyp autoinduziert ist, in der Deletionsmutante aber natürlich fehlt. HydH, das das gleiche Muster zeigen sollte, kann bei dieser Auftrennung nicht erkannt werden, da der



rechnerische pI dieses Proteins bei 9,16 liegt. Außerdem waren zwei Proteine von jeweils etwa 26 kDa erkennbar (pI ca. 5,6 bzw. 5,8), die in MC4100 in einer um ein Vielfaches größeren Menge vorlagen als in MC4100ΔG (Abbildung 27). Umgekehrt konnte ein Protein identifiziert werden (ca. 18 kDa, pI 5,5), das in der Deletionsmutante stärker produziert wird als im Wildtypstamm.



**Abbildung 27:** Drei in ihrer zellulären Konzentration von HydG abhängige Proteine. Ausschnitt aus Autoradiogrammen von repräsentativen 2D-Gelen. MC4100 (A) und MC4100ΔG (B) wurden in Minimalmedium in Gegenwart von 1 mM ZnCl<sub>2</sub> angezogen und mit <sup>35</sup>S markiert. Die Auftrennung der Zellextrakte erfolgte in erster Dimension in einem linearen Gradienten von pH 4 bis 7, in zweiter Dimension in 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgelen. Die entsprechenden Proteine sind durch Kreise markiert.

Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise darauf, daß HydG auch die Expression weiterer Gene beeinflussen könnte und zwar sowohl positiv wie auch negativ. Ob dieser Einfluß durch direkte Regulation der Transkription erfolgt oder auf einem indirektem Weg, zum Beispiel über die Wirkung von ZraP, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden. Eine Identifizierung der regulierten Gene durch Isolierung der aufgetrennten Proteine und Bestimmung ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz wäre der erste Schritt auf dem Weg zur endgültigen Aufklärung der physiologischen Funktion des HydH/G-Zwei-Komponenten-Systems.

## DISKUSSION

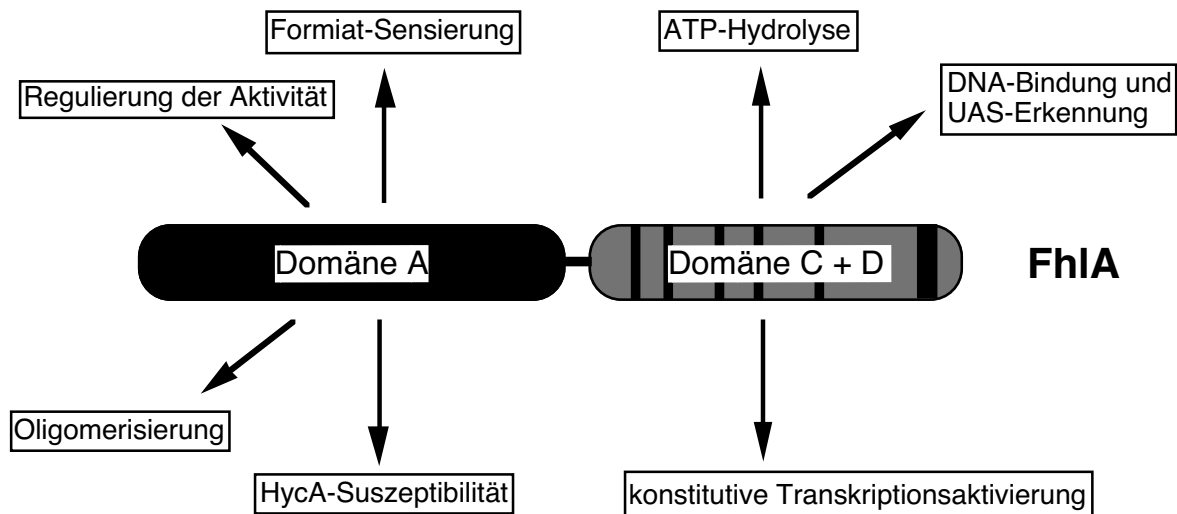
### 1. Domänenstruktur und Wirkungsmechanismus des Transkriptionsaktivators FhIA

Die Aktivität des Transkriptionsaktivators FhIA umfaßt eine Reihe von einzelnen Reaktionsschritten, die durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Das Protein ist nach Oligomerisierung in der Lage, mit DNA zu interagieren und an spezifische Sequenzen zu binden (Schlensog *et al.*, 1994). Durch Bindung des Effektors Formiat wird FhIA in seine aktive Form überführt, welche durch Interaktion mit der  $\sigma^{54}$ -assoziierten RNA-Polymerase eine Aktivierung der Transkription der Gene des Formiat-Regulons bewirkt (Hopper *et al.*, 1996). Zusätzlich wird die Aktivität von FhIA durch HycA negativ beeinflusst (Hopper, 1995; Sauter *et al.*, 1992). Ob dies durch direkte Bindung oder durch eine Beeinflussung des intrazellulären Formiat-Spiegels erfolgt, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Um den Mechanismus all dieser komplexen Vorgänge aufzuklären, sollte in dieser Arbeit eine Untersuchung der Struktur und der Funktion der Domänen von FhIA durch Zuordnung von einzelnen Teilaktivitäten zu bestimmten Proteinabschnitten erfolgen.

Durch Sequenzvergleich mit anderen Regulatoren und ihren verkürzten Derivaten wurde eine theoretische Einteilung von FhIA in Domänen vorgenommen (Leonhartsberger *et al.*, 2000). Die C-terminale Hälfte des Transkriptionsaktivators (FhIA-C, Aminosäuren 379-693) zeigt Ähnlichkeit zu zentralen Domänen anderer Aktivatoren, welche die ATP-Binde- und Hydrolysemotive beinhalten und mit  $E\sigma^{54}$  interagieren. Außerdem umfaßt FhIA-C die C-terminale Domäne, die ein Helix-Turn-Helix-Motiv aufweist. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß FhIA-C tatsächlich die erwarteten Aktivitäten und Eigenschaften besitzt (Abbildung 28).

So konnte *in vivo* nachgewiesen werden, daß FhIA-C zur Transkriptionsaktivierung an FhIA-spezifischen Promotoren in der Lage ist. Das setzt die Fähigkeit voraus, mit  $E\sigma^{54}$  zu interagieren und ATP zu hydrolysieren. Eine entsprechende ATPase-Aktivität konnte auch *in vitro* für FhIA-C nachgewiesen werden und sie war durch die Zugabe von DNA stimulierbar. Diese Stimulation war im Falle von DNA, die die spezifische FhIA-Bindestelle enthielt, stärker als bei unspezifischer DNA. Der C-terminale Bereich ist also für die spezifische Erkennung und Bindung von DNA ausreichend und besitzt auch alle Eigenschaften, die für eine Aktivierung der  $E\sigma^{54}$ -abhängigen Transkription nötig sind. Die Aktivität von FhIA-C ist im Gegensatz zu Holo-FhIA jedoch nicht durch Formiat modulierbar, sondern sie ist konstitutiv. Dies deutet darauf hin, daß die N-terminale Domäne an der Formiat-Bindung zumindest beteiligt, wenn nicht alleine dafür verantwortlich ist, wofür auch Mutationsstudien von FhIA sprechen (Korsa und Böck, 1997). Andererseits läßt sich aus der Tatsache, daß die Aktivität von FhIA-C zwar nicht mehr durch Formiat induzierbar ist, aber auf den Liganden DNA in der

gleichen Weise wie FhIA reagiert, schließen, daß die spezifische DNA-Bindung und die Formiat-Sensierung in FhIA als zumindest partiell getrennte Prozesse ablaufen und nicht kooperativ erfolgen.



**Abbildung 28:** Zuordnung der verschiedenen Funktionen von FhIA zu den einzelnen Domänen. Das Modell stellt eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse dar und wird im Text ausführlich diskutiert.

Schon in der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit konnte gezeigt werden, daß der ungewöhnlich lange und keine Homologien zu anderen Proteinen aufweisende N-terminale Teil des Transkriptionsaktivators (FhIA-N, Aminosäuren 1-378) *in trans* einen negativen Effekt auf die Aktivität von FhIA ausübt. Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte die C-terminale Hälfte als die eigentlich aktive identifiziert werden. Die Funktion der N-terminalen Domäne liegt offensichtlich darin, die Aktivität des restlichen Proteins zu modulieren, indem es sie in Abwesenheit des Induktors Formiat unterdrückt. Das Konzept der intramolekularen Aktivitätsmodulation durch die N-terminale Domäne wird auch in anderen Regulatorproteinen umgesetzt. So zeigen etwa C-terminale Fragmente von XylR, DmpR und DctD (Fernández *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994; Ng *et al.*, 1996; Pérez-Martín und de Lorenzo, 1996a) konstitutive Aktivität, die unabhängig von der Bindung des Effektor-moleküls ist. Auch in diesen Fällen zeigte sich, daß die N-terminale Domäne die Aufgabe hat, unter nicht-induzierenden Bedingungen die Aktivität des C-terminalen Teils zu unterdrücken und es wurde ein Modell entwickelt, in welchem die N-terminale Domäne ohne Induktor die katalytisch relevanten Stellen des Restmoleküls maskiert. Eine detaillierte Analyse der Kinetik der Aktivität von FhIA und von semi-konstitutiven FhIA-Mutanten ergab jedoch, daß die Bindung von Formiat eine erhöhte Affinität von FhIA für ATP zur Folge hat und die Reaktionsgeschwindigkeit der ATP-Hydrolyse steigert (Korsa und Böck, 1997). In

diesem Zusammenhang konnte mittels limitierter Proteolyse in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, daß die Bindung des Induktors Formiat in FhIA keine größeren strukturellen Umlagerungen bewirkt. Darüberhinaus unterscheidet sich der für FhIA zu postulierende Mechanismus in einem wesentlichen Punkt von dem für XylR und DmpR vorgeschlagenen Modell: während die N-terminale Domäne von XylR und DmpR mit einem verkürzten Regulatormolekül, das die restlichen Domänen enthält, in der Weise interagiert, daß die konstitutive Aktivität des verkürzten Regulators völlig unterdrückt wird (O'Neill *et al.*, 1998; Pérez-Martín und de Lorenzo, 1995b), verhält sich FhIA anders. Auch in Gegenwart von FhIA-N zeigt FhIA-C seine konstitutive Aktivität. Die Interaktion der Domänen erfordert also eine kovalente Verbindung der beiden Proteinteile.

Des weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die Aktivität von FhIA-C unabhängig von einer HycA-Überproduktion ist. Da der Wirkungsmechanismus von HycA bis zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt ist, muß die Ursache dafür Gegenstand von Spekulationen bleiben. Falls die Wirkung von HycA auf die Aktivität von FhIA durch direkte Interaktion der beiden Proteine erfolgt (Korsa, 1998), was eine Wirkungsweise analog zu NifA/L (Dixon, 1998) implizieren würde, müßte eine Unempfindlichkeit von FhIA-C gegen HycA in der Weise interpretiert werden, daß die für diese Interaktion nötigen Bereiche in FhIA-C nicht vorhanden sind und damit in der N-terminalen Domäne von FhIA liegen. Wirkt HycA jedoch über eine Beeinflussung der intrazellulären Formiatkonzentration, so bewirkt eine fehlende Formiat-Sensierung gleichzeitig eine Unempfindlichkeit gegenüber HycA. Die Wirkungsweise von HycA, einem Protein, für das in anderen Regulationssystemen bisher keine Entsprechungen gefunden wurden, bleibt ein wichtiges und interessantes Forschungsgebiet.

Die N-terminale Domäne von FhIA besitzt außerdem offenbar eine strukturelle Funktion, indem sie die Oligomerisierung des Transkriptionsaktivators vermittelt: während FhIA-N wie FhIA selbst nach der Reinigung als Tetramer vorliegt (Leonhartsberger *et al.*, 2000; Schlenzog *et al.*, 1994), wurde FhIA-C als Monomer gereinigt. Es ist jedoch nicht geklärt, ob FhIA-C seine Aktivität auch in diesem Zustand ausübt, oder ob es etwa erst nach Bindung von ATP oder DNA oligomerisiert. Diese Oligomerisierungsfunktion der N-terminalen Domäne von FhIA ist außergewöhnlich, da diese Funktion bei vielen anderen Transkriptionsaktivatoren von der zentralen oder C-terminalen Domäne übernommen wird (Flashner *et al.*, 1995; Klose *et al.*, 1994).

Strukturuntersuchungen mittels limitierter Trypsinolyse ergaben für FhIA zwei relativ stabile Zwischenprodukte, die jeweils der Größe von FhIA-C bzw. FhIA-N entsprechen. Eine Identität würde darauf hindeuten, daß sich FhIA auch im nativen Zustand in Domänen faltet, die den theoretisch ermittelten entsprechen. Dafür spricht auch, daß FhIA-N relativ stabil gegenüber der Protease ist, sich also in eine kompakte Domäne faltet. Die gewählten

Domänengrenzen scheinen demnach den physiologischen tatsächlich zu entsprechen. Eine Formiat-induzierte Konformationsänderung konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, jedoch weist eine veränderte Protease-Suszeptibilität in Gegenwart von AMP-PCP auf eine Änderung der Konformation von FhIA nach ATP-Bindung hin. Diese könnte auch bei der Oligomerisierung von FhIA eine Rolle spielen.

Durch ein Screening innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae konnte Aufschluß über die Verbreitung des FHL-Regulationssystems erhalten werden. Untersuchungen auf Protein- und DNA-Ebene ergaben, daß in *S. typhimurium* TL 117, *E. aerogenes*, *K. oxytoca* M5a1, *K. terrigena* 2687 und *C. freundii* ein zu FhIA orthologes Protein zu finden ist. Dagegen ergab sich in den Arten *P. mirabilis* 30115, *P. vulgaris* 2140 und *S. marcescens* 3012 kein Hinweis auf ein entsprechendes Protein. Die große phylogenetische Entfernung zu *E. coli* könnte erklären, daß ein derartiges Protein entweder nicht existiert oder im Vergleich zu FhIA<sub>Ec</sub> derart verändert ist, daß das Protein bzw. das dafür kodierende Gen mit den Antikörpern bzw. Sonden nicht mehr detektiert werden kann. Tatsächlich spiegelt auch die Sequenzähnlichkeit der FhIA-Proteine von *E. coli*, *S. typhimurium*, *K. oxytoca* und *E. aerogenes* genau den Grad der phylogenetischen Verwandtschaft wider. Insgesamt ist der Grad der Identität zwischen den vier Proteinen recht hoch und erstreckt sich praktisch über die gesamte Sequenz. Dadurch ist auch zu erklären, daß FhIA<sub>Ko</sub> und FhIA<sub>Ea</sub> das Regulatorprotein von *E. coli* funktionell ersetzen können und bezüglich ihrer Aktivität unter aeroben und anaeroben Bedingungen und in Gegenwart und Abwesenheit von Formiat gleiche Muster aufweisen. Beide FhIA-Orthologe zeigten auch die gleiche Suszeptibilität gegenüber überproduziertem HycA von *E. coli*, wobei hier wieder die Interpretation des Ergebnisses offen bleiben muß.

## 2. Unspezifische Aktivierung des *hyc*-Operons durch HydG

Die Gene *hydH* und *hydG*, die für ein Zwei-Komponenten-System kodieren, waren 1989 von Stoker *et al.* mit der Regulation der Hydrogenase 3 in Zusammenhang gebracht worden. Obwohl kurze Zeit später FhIA als Regulator des *hyc*-Operons identifiziert werden konnte und in den folgenden Jahren das Formiat-Regulon beschrieben wurde (Schlensog und Böck, 1990; Übersicht in Leonhartsberger *et al.*, 2001b), konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, daß HydH/G ebenfalls an der Regulation der Hydrogenase 3 beteiligt ist und eventuell einen mit FhIA überlappenden Regulationskreis bildet. Darüberhinaus stellte sich heraus, daß überproduziertes HydG aus *K. oxytoca* eine Verstärkung der Transkription einer *hycA*'-*lacZ*- und einer *fdhF*'-*lacZ*-Fusion in *E. coli* bewirkt. Diese Aktivität war in außerordentlich hohem Maße abhängig von anaeroben Bedingungen, jedoch nicht durch Formiat oder die Überproduktion von HycA beeinflussbar. HydH war für die Aktivierung der

Transkription nicht unbedingt nötig, da von dem entsprechenden Gen aus *K. oxytoca* die ersten 519 Basenpaare in dem System nicht enthalten waren. Die hohe Aktivität von HydG<sub>Ko</sub> sprach aber für eine Aktivierung, also Phosphorylierung dieses Regulators. Dies könnte durch eine eventuelle konstitutive Aktivität des verkürzten Sensorproteins bewirkt werden, welches immerhin noch den konservierten Histidinrest, der der Homologie zufolge das Substrat der Autophosphorylierung sein dürfte, und etwa drei Viertel der Gesamtsequenz, jedoch nicht die N-terminalen Transmembranbereiche enthält. Eine andere Möglichkeit wäre eine Phosphorylierung durch Moleküle wie Acetylphosphat oder Sensorkinasen eines anderen Regulationssystems. Eine Inaktivierung von *hydH* aus *E. coli* reduzierte die Aktivität von HydG<sub>Ko</sub> zum Teil, was einerseits dafür spricht, daß HydG<sub>Ko</sub> tatsächlich mit dem heterologen Sensorprotein interagiert, aber andererseits zeigt, daß die Aktivität von HydG<sub>Ko</sub> nicht ausschließlich darauf zurückgeführt werden kann. Vermutlich sind andere Sensorkinasen an der unspezifischen Aktivierung von HydG<sub>Ko</sub> beteiligt, was ein typisches Beispiel von "cross-talk" wäre. Die Tatsache, daß die Aktivierung von HydG<sub>Ko</sub> nicht auf dem klassischen Weg abläuft, war ein Hinweis darauf, daß der beobachtete Effekt unter Umständen nicht auf die physiologische Funktion des HydH/G-Zwei-Komponenten-Systems zurückzuführen ist.

Entsprechende Untersuchungen mit dem homologen Regulatorprotein HydG<sub>Ec</sub> in *E. coli* brachten Klarheit über die Rolle von HydH/G bei der Regulation der Hydrogenase 3. *In vivo*- und *in vitro*-Analysen zeigten, daß HydH/G unter physiologischen Bedingungen nicht an einer Regulation der Gene des Formiat-Regulons beteiligt sind. Alle gemessenen Effekte sind nur unter den unphysiologischen Bedingungen der Überproduktion zu erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Kontrolle der Spezifität der verschiedenen Regulationssysteme in der Zelle aufgrund der Konserviertheit der Mechanismen und der funktionellen Domänen sehr sensibel und schwierig ist, und daß eine Überproduktion oder heterologe Expression leicht zur Störung des Gleichgewichts führen kann, was unspezifische Effekte zur Folge hat. So ist auch die Aktivität von HydG<sub>Ko</sub> im heterologen System höher und bei mehreren Promotoren wirksam, da unter diesen Umständen mehr "cross-talk" stattfindet, weil die artspezifischen Kontrollmechanismen nicht greifen können. Die bei HydH/G beobachteten Effekte sind ein hervorragendes Beispiel für unspezifischen "cross-talk".

Die Stimulation der HydG<sub>Ec</sub>-abhängigen *hycA*-Transkription unter anaeroben Bedingungen könnte durch eine veränderte Topologie der DNA und daraus folgende leichtere Zugänglichkeit der entsprechenden Promotorbereiche begründet sein. Ähnliche Regulationseffekte durch einen erhöhten Grad an Supercoiling unter anaeroben Bedingungen wurden des öfteren beobachtet (Bhriain *et al.* 1989; Dorman *et al.*, 1988). Völlig ungeklärt bleiben muß an dieser Stelle die Ursache der in Abwesenheit von FhIA durch Formiat bewirkten Stimulation der *hycA*-Transkription durch HydG. Entweder wirkt Formiat direkt auf HydG oder es liegt ein indirekter Effekt zugrunde, was ein Hinweis auf einen weiteren Formiat-Sensor in

der Zelle sein könnte. Eine Untersuchung der Funktion von HyfR, des putativen Regulators des *hyf*-Operons und der FhlA-unabhängigen Formiat-Induktion des *cyx-appA* Operons und des *appY*-Gens könnte unter Umständen auch zur Klärung dieser Frage beitragen.

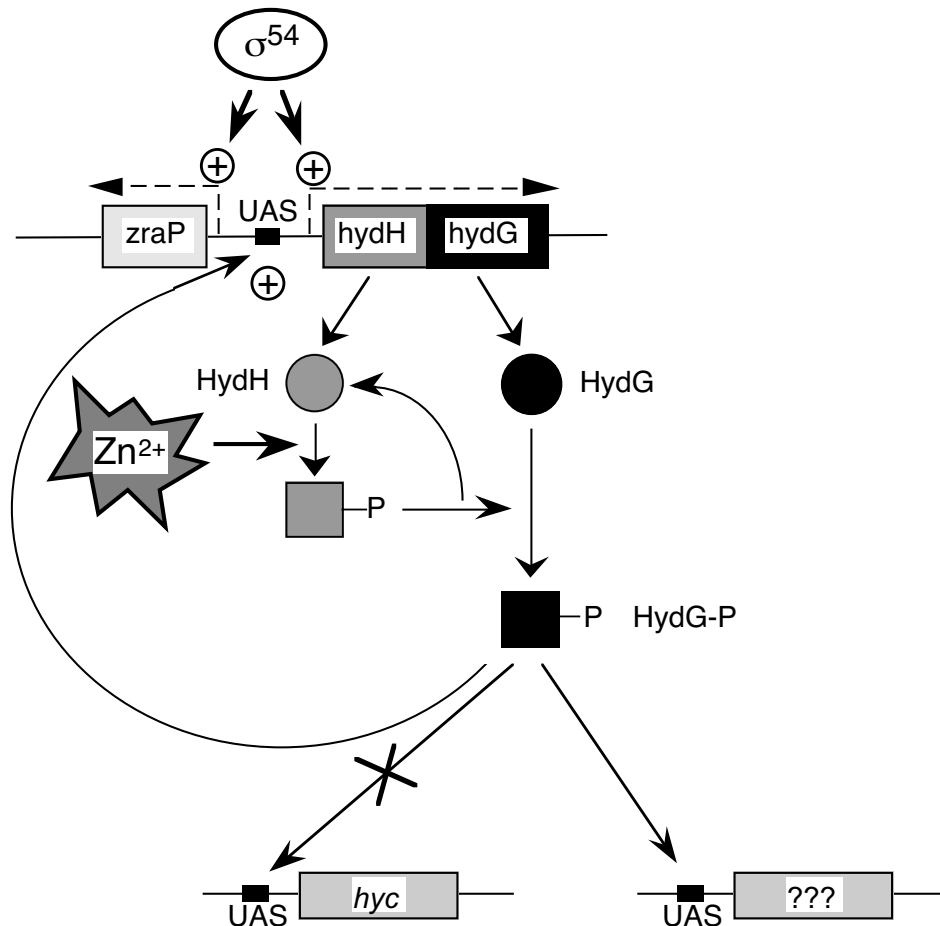
### 3. HydG als $\sigma^{54}$ -abhängiger Transkriptionsaktivator von *zraP*

Nachdem durch die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich geworden war, daß das HydH/G-Zwei-Komponenten-System nicht an der Regulation der Gene für die Hydrogenase 3 beteiligt ist, war die Identifizierung der Zielgene dieses Regulationssystems der nächste Schritt in der Aufklärung der tatsächlichen Funktion von HydH/G. Durch Gelretardations- und DNase I Footprinting-Analysen wurde eine DNA-Bindestelle für HydG ermittelt, die eine präzise Symmetrie aufweist. Diese befindet sich in der intergenen Region zwischen dem *hydHG*-Operon und dem Gen *zraP* (ehemals *yjaI*). Das Gen *zraP* (zinc resistance-associated protein) kodiert für ein 20 kDa großes Protein, dessen 12 kDa großes C-terminales Fragment nach Prozessierung im Periplasma vorliegt und mit einer Resistenz gegen hohe Zink-Konzentrationen assoziiert werden konnte (Noll *et al.*, 1998). Die HydG-Bindestelle ist mit 55 Basenpaaren relativ lang und aufgrund der Symmetrie zweier identischer 17mere liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei der 55 bp-Region eigentlich um zwei Bindestellen handelt. Wie die Untersuchungen der HydG-abhängigen Expression von *zraP* und *hydH/G* zeigten, stellt diese 55 bp lange Bindestelle tatsächlich eine in zwei Richtungen wirksame UAS dar.

Durch Expressionsstudien mit Translationsfusionen konnte nachgewiesen werden, daß die Transkription von *zraP* tatsächlich spezifisch durch das HydH/G-Zwei-Komponenten-System reguliert wird. Eine Transkriptionsaktivierung erfolgt nur in gleichzeitiger Gegenwart von *hydH* und *hydG*, wenn außerdem hohe Konzentrationen an  $\text{Zn}^{2+}$ - oder  $\text{Pb}^{2+}$ -Ionen im Medium vorliegen. Damit war die Identifizierung eines Zielgens des HydH/G-Zwei-Komponenten-Systems gelungen (Abbildung 29).

Des weiteren konnte gezeigt werden, daß das HydH/G-System tatsächlich einer positiven Autoregulation unterliegt, wie es auch bei vielen anderen Transkriptionsregulatoren der Fall ist (Drummond *et al.*, 1983; Himpens *et al.*, 2000; Schlensog, 1993). Diese Regulation benötigt ebenfalls das Zusammenspiel von Sensorkinase HydH und Regulatorprotein HydG und zeigt auch die gleiche spezifische Abhängigkeit von hohen  $\text{Zn}^{2+}$ - oder  $\text{Pb}^{2+}$ -Konzentrationen.

Darüberhinaus konnte sowohl für die Expression von *zraP* als auch von *hydH/G* gezeigt werden, daß sie abhängig vom alternativen Sigmafaktor  $\sigma^{54}$  sind. Die naheliegende Annahme, daß hierfür die identifizierten putativen  $\sigma^{54}$ -Promotoren verantwortlich sind, welche auch in der erwarteten Entfernung von der HydG-Bindestelle lokalisiert sind, bedarf allerdings noch der experimentellen Bestätigung. Gleichzeitig zeigten die Ergebnisse, daß für



**Abbildung 29:** Modell der Wirkungsweise und Aktivität des HydH/G-Zwei-Komponenten-Systems. Das Modell wird im Text detailliert erläutert.

das *hydHG*-Operon auch ein schwacher konstitutiver Promotor existieren muß. Dies hat zur Folge, daß zu jedem Zeitpunkt in der Zelle eine geringe Menge an HydH und HydG vorliegt, so daß bei induzierenden Bedingungen eine Antwort erfolgen kann, indem die Expression von *hydH/G* verstärkt und die Transkription von *zraP* aktiviert wird.

Als spezifischer auslösender Stimulus für die Aktivität von HydG konnte eine  $Zn^{2+}$ -Konzentration von über 0,5 mM oder eine ebenfalls sehr hohe  $Pb^{2+}$ -Konzentration identifiziert werden. Andere zweiwertige Metallionen zeigten keinen induzierenden Effekt. Es konnte gezeigt werden, daß diese Abhängigkeit der Aktivität von HydG von hohen  $Zn^{2+}$ - bzw.  $Pb^{2+}$ -Konzentrationen HydH-vermittelt ist. Es ist jedoch noch nicht klar, ob die Sensierung von  $Zn^{2+}$  bzw.  $Pb^{2+}$  durch direkte Bindung an HydH erfolgt, oder auf indirektem Wege geschieht. Zwar konnte bisher kein klassisches Zink-Bindemotiv wie zum Beispiel das in Zink-Metalloendopeptidasen vorkommende Motiv HEXXH (Rawlings und Barrett, 1991) in der Primärsequenz von HydH identifiziert werden, doch finden sich 13 Histidin-Reste, ein Cystein und einige andere Reste, die an der Bindung der Metallionen beteiligt sein könnten. Vor allem das Motiv  $H_{159}GMHNMPCR_{167}$  könnte diese Funktion erfüllen, da es zwischen den beiden



putativen Transmembrandomänen von HydH liegt und damit vermutlich periplasmatisch orientiert ist. Diese Annahme muß durch direkte Zink-Bindestudien mit gereinigtem HydH oder durch Mutationsanalysen in den putativen Zink-Bindemotiven überprüft werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann auch nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob *zraP* nur von HydH/G reguliert wird oder seinerseits die Aktivität des Zwei-Komponenten-Systems beeinflusst. Nachdem für das C-terminale Fragment von ZraP Zink-Bindung nachgewiesen wurde (Noll *et al.*, 1998), wäre es auch denkbar, daß ZraP HydH/G aktiviert, etwa durch direkte Protein-Protein-Interaktion. Diese Frage müßte mit Hilfe von *zraP*-Deletionsmutanten geklärt werden. Im Gegensatz zur Aktivierung der Transkription des *hyc*-Operons durch HydG war die Aktivierung der *zraP*-Expression nicht abhängig von anaeroben Bedingungen, was einen weiteren Unterschied zwischen der unspezifischen und der spezifischen Aktivierung darstellt.

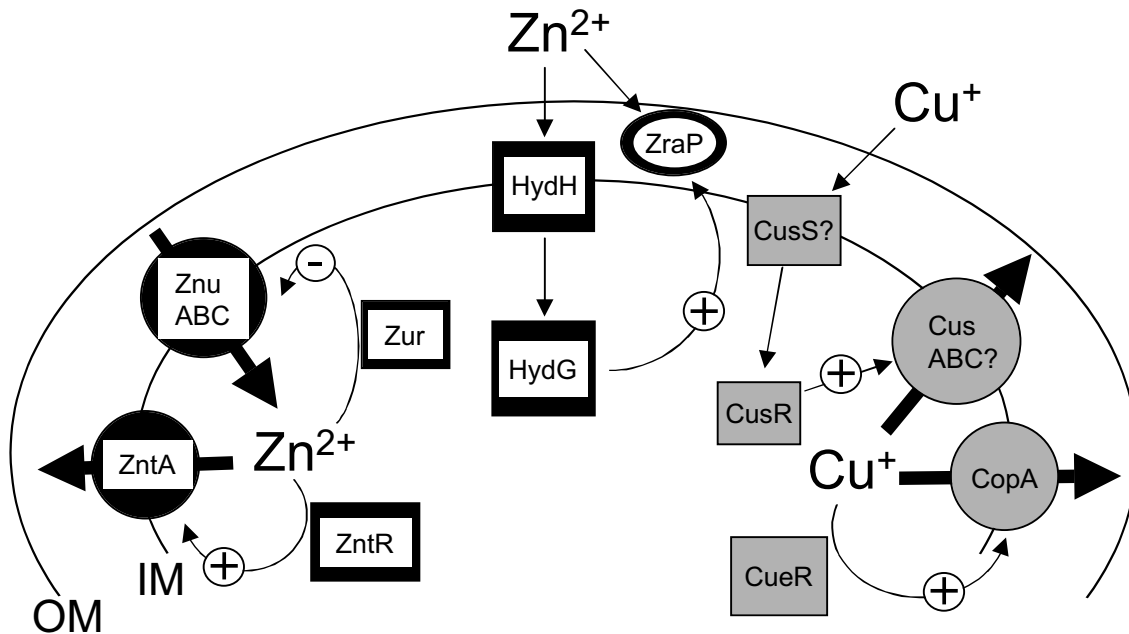
Es konnte gezeigt werden, daß die DNA-Bindung von gereinigtem HydG in Gegenwart von Acetylphosphat und Carbamoylphosphat deutlich gesteigert ist. Dies deutet darauf hin, daß HydG durch Phosphorylierung aktiviert wird. Daß die Aktivierung von HydG normalerweise durch HydH katalysiert wird, wurde durch Expressionsstudien bewiesen, daß sie wie bei anderen Zwei-Komponenten-Systemen durch Phosphatgruppentransfer erfolgt, erscheint plausibel, muß aber experimentell noch gezeigt werden.

#### 4. Physiologische Rolle des HydH/G-Zwei-Komponenten-Systems

In dieser Arbeit konnte der schlüssige Beweis erbracht werden, daß das HydH/G-Zwei-Komponenten-System in *E. coli* die Expression des Gens *zraP* reguliert. Diesem Ergebnis steht der Befund gegenüber, daß eine Anreicherung des C-terminalen Fragmentes von ZraP in *E. coli* in Gegenwart von hohen  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen und des Transkriptionsaktivators PMTR erfolgt (Noll *et al.*, 1998). PMTR ist ein Protein aus *Proteus mirabilis*, das einen hohen Grad an Sequenzähnlichkeit zu Regulatoren der MerR-Familie aufweist, insbesondere zu ZntR (früher YdhM; Brocklehurst *et al.*, 1999) und CueR (früher Ybbl; Outten *et al.*, 2000; Stoyanov *et al.*, 2001) aus *E. coli*. Sämtliche frühere Experimente, in denen ein Einfluß auf die Konzentration von ZraP beobachtet wurde, wurden mit dem heterologen PMTR durchgeführt und es wurde postuliert, daß die Expression von *zraP* in *E. coli* durch eines seiner oben erwähnten Homologe aktiviert wird. ZntR und CueR konnten jedoch als Regulatoren anderer Gene identifiziert werden (Brocklehurst *et al.*, 1999; Stoyanov *et al.*, 2001) und in der 5'-Region von *zraP* konnte keine Sequenz gefunden werden, die der ZntR- oder der CueR-Bindestelle entspricht, was die Regulation von *zraP* durch diese Regulatoren zumindest fraglich macht. Außerdem wurde von Noll *et al.* (1998) nicht gezeigt, daß die Expression von *zraP* direkt von PMTR abhängt. Es konnte sogar eine

Zunahme von ZraP bei Erhöhung der  $Zn^{2+}$ -Konzentration in der Abwesenheit von PMTR beobachtet werden (Noll *et al.*, 1998). Ein weiterer zu berücksichtigender Punkt ist, daß die durch MerR-ähnliche Regulatoren aktivierte Expression in der Regel an  $\sigma^{70}$ -abhängigen Promotoren erfolgt (Brocklehurst *et al.*, 1999; Kulkarni und Summers, 1999; Stoyanov *et al.*, 2001), während die Expression von *zraP* strikt abhängig von  $\sigma^{54}$  ist.

Eine Anreicherung des C-terminalen Fragmentes von ZraP wurde im Zusammenhang mit Resistenz gegen Zink beschrieben und es konnte gezeigt werden, daß dieses Proteinfragment  $Zn^{2+}$ -Ionen und in geringerem Maße  $Ni^{2+}$  und  $Co^{2+}$  bindet, wenn diese in hohen Konzentrationen vorliegen (Noll *et al.*, 1998). Daher lag die Frage nahe, ob ZraP bzw. HydH/G tatsächlich an der Ausbildung von Resistenz gegen  $Zn^{2+}$ - oder andere Metallionen beteiligt ist. Zink, Kupfer, Cobalt, Nickel und andere Metalle sind essentiell für die Funktion oder die strukturelle Stabilität von mehreren Proteinen in *E. coli* (Berg und Shi, 1996; Nies, 1992; Romao *et al.*, 1997). Hohe Konzentrationen an Metallionen sind jedoch für die Zelle toxisch, da sie verschiedene Zellfunktionen inhibieren (Hoshino *et al.*, 1999; Trevors *et al.*, 1986). Deshalb ist die Homöostase dieser Metallionen sehr wichtig für die Zelle und es wurden sowohl hochaffine Aufnahmesysteme für Metallionen gefunden, als auch diverse Entgiftungssysteme (Abbildung 30). So wurde für Zink das Bindeprotein-abhängige Transportsystem ZnuABC identifiziert. Dieses steht unter der Kontrolle des Repressors Zur, ein Protein das nach Zink-Bindung die Expression der Gene *znuABC* reprimiert und Ähnlichkeit zu Fur, dem Eisen-Aufnahme-Regulator (Bagg und Neilands, 1987; Escolar *et al.*, 1999) aufweist (Patzer und Hantke, 1998; Patzer und Hantke, 2000). Vor allem die Aktivität einer Kationen-spezifischen P-Typ ATPase ermöglicht *E. coli* das Wachstum auch in Gegenwart relativ hoher Zink-Konzentrationen (Beard *et al.*, 1997). Diese ATPase exportiert  $Zn^{2+}$  und in geringerem Ausmaß  $Pb^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  und wird von dem Gen *zntA* kodiert (Rensing *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2000). Die Expression von *zntA* wird durch ZntR reguliert, dem oben schon erwähnten MerR-ähnlichen Transkriptionsaktivator (Brocklehurst *et al.*, 1999). ZntR reagiert auf  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  und  $Pb^{2+}$ , wobei  $Cd^{2+}$  der effektivste Induktor ist (Binet und Poole, 2000). Es wäre trotzdem denkbar, daß mit dem von HydH/G reguliertem ZraP ein zweites System an der Entgiftung von Zink beteiligt ist, vor allem, da sich das Induktionsspektrum von HydH/G von dem von ZntR unterscheidet. Auch bei der Entgiftung von Kupferionen in *E. coli* existieren zwei unterschiedliche Systeme nebeneinander. Während CopA, die Kupfer-Efflux-ATPase durch das zu MerR homologe Protein CueR reguliert wird, wurde zusätzlich mit CusS/R ein Zwei-Komponenten-System gefunden, das die Transkription seiner benachbarten Gene reguliert, welche für einen Protonen/Kationen-Antiporter kodieren (Munson *et al.*, 2000). CusS/R könnte den Kupferspiegel im Periplasma sensieren, während CueR vermutlich ein cytoplasmatischer Regulator ist (Outten *et al.*, 2000).



**Abbildung 30:** Das HydH/G-Regulationssystem im Zusammenhang mit den Transportsystemen für  $\text{Cu}^+$  und  $\text{Zn}^{2+}$  und ihrer Regulation in *E. coli*. Rechtecke stellen Regulatorproteine dar, Kreise am Transport beteiligte Proteine. Dicke Pfeile symbolisieren Transport, dünne Pfeile Interaktion bzw. Regulation. Die am Transport von  $\text{Cu}^+$ -Ionen beteiligten Proteine sind grau dargestellt, das  $\text{Zn}^{2+}$ -System schwarz. OM: äußere Membran, IM: Cytoplasmamembran.

In analoger Weise könnte HydH/G an der periplasmatischen Zink-Sensierung beteiligt sein, während ZntR im Cytoplasma wirkt. Ein Überlappen der beiden Regulationszyklen kann nicht ausgeschlossen werden.

Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente konnte bisher jedoch kein Zusammenhang zwischen der HydH/G-abhängigen *zraP*-Expression und der Zink-Toleranz der Zellen hergestellt werden. Die in Noll *et al.* (1998) und der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse könnten in der Weise interpretiert werden, daß die in Anwesenheit von PMTR beobachtete erhöhte Zink-Toleranz der Zellen darauf zurückzuführen ist, daß PMTR wie überproduziertes ZntR wirkt, die beobachtete Zunahme von ZraP im Periplasma dagegen auf die durch HydH/G in Gegenwart von  $\text{Zn}^{2+}$  bewirkte erhöhte Transkriptionsaktivierung von *zraP* zurückzuführen ist.

Demnach wäre die physiologische Rolle von HydH/G in anderen Funktionen zu suchen, wofür mehrere Möglichkeiten denkbar sind. Ein Einfluß von HydG auf das Wachstum von Zellen konnte unter bestimmten Bedingungen gezeigt werden, wenn diese aus Zink-freiem Medium in solches, das mit 1 mM  $\text{ZnCl}_2$  supplementiert war, transferiert wurden. Zellen, die *hydG* enthielten, zeigten nach diesem Transfer eine wesentlich längere lag-Phase als *hydG*-Deletionsmutanten. Für diesen Effekt genügten die geringen Mengen an

HydG, die in einer *hydH*-Deletionsmutante vorliegen; *hydH* spielt keine wichtige Rolle. HydG könnte daher an der Modulation des Wachstums auf das plötzliche Auftreten toxischer Zink-Konzentrationen hin beteiligt sein. In Analogie zur Reaktion auf andere schädliche Reize wie UV-Bestrahlung stellen die Zellen das Wachstum zunächst ein, vermutlich um das Ausmaß der Schädigung möglichst gering zu halten, bis die Entgiftungssysteme wirksam werden.

Auch zur Klärung der physiologischen Rolle von ZraP bedarf es noch detaillierter Untersuchungen. So ist die Beteiligung von ZraP an der Ausbildung von Zink-Toleranz nur eine denkbare Möglichkeit, die jedoch angesichts der diskutierten Ergebnisse immer unwahrscheinlicher erscheint. Die nachgewiesene Bindung von Zink an ZraP könnte andere periplasmatische Proteine vor hohen Zink-Konzentrationen schützen. Dies wäre für die Zelle jedoch mit einem sehr hohen Energieaufwand verbunden, wenn man die für Transkription, Translation, Export und Prozessierung eines Moleküls ZraP benötigte Energie dem Vorteil durch die Entgiftung eines oder zweier  $Zn^{2+}$ -Ionen gegenüberstellt. Eine andere Möglichkeit wäre eine Beteiligung von ZraP im Komplex mit Zink an der Faltung, Prozessierung oder Reifung von periplasmatischen Proteinen. Gerade im Hinblick auf die Selektivität der Induktion des HydH/G-Systems wäre auch denkbar, daß ZraP bei der Modulation der Kationenselektivität von Metalltransportern wie ZntA eine Rolle spielt oder die Aufnahme von  $Zn^{2+}$  durch nieder-affine Metall-Aufnahmesysteme beeinflusst.

Einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der physiologischen Funktion von HydH/G könnte eine Identifizierung weiterer von HydG regulierter Gene leisten. Zwar konnte bisher keine zweite HydG-Bindestelle im Genom von *E. coli* identifiziert werden, jedoch zeigte der Proteomvergleich mittels 2D-Gelelektrophorese die Existenz weiterer Proteine, deren zelluläre Konzentration durch HydG beeinflusst wird. Entweder ist die Expression der entsprechenden Gene auch direkt durch HydG reguliert, aber die jeweiligen Bindestellen sind so verschieden von den in der *zraP-hydH*-intergenen Region lokalisierten, daß sie sich einer Entdeckung mittels Sequenzvergleich entzogen, oder die Beeinflussung erfolgt indirekt, zum Beispiel über ZraP. In beiden Fällen würde die Identifizierung und Analyse der fraglichen Proteine zweifellos die physiologische Funktion von HydH/G weiter erhellen.

Durch die hier beschriebenen und diskutierten Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß die physiologische Funktion des Zwei-Komponenten-Systems HydH/G nicht, wie früher berichtet, in der Regulation der Expression der Gene für die Hydrogenase 3 liegt. Aus diesem Grund scheint eine Umbenennung der Gene *hydH* und *hydG* sinnvoll. Ein Vorschlag hierfür wäre *zraS* für *hydH* und *zraR* für *hydG*, weil damit der Bezug zu dem von den entsprechenden Proteinen regulierten Gen *zraP* hergestellt würde.

## ZUSAMMENFASSUNG

Das  $\sigma^{54}$ -abhängige Regulatorprotein FhIA aktiviert die Transkription der für die Bildung eines funktionellen Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplexes nötigen Gene. Hierfür weist es eine Reihe von Aktivitäten auf, nämlich ATP-Hydrolyse, Interaktion mit  $E\sigma^{54}$  und Stimulierung der Transkription. Die Aktivität von FhIA wird durch Bindung von Formiat und von spezifischen DNA-Sequenzen (UAS) stimuliert und durch HycA negativ beeinflusst. Sequenzähnlichkeiten von FhIA zu anderen Transkriptionsaktivatoren lassen auf einen Aufbau aus drei Domänen schließen. Die in der vorliegenden Arbeit erfolgte Struktur-Funktions-Analyse lieferte wichtige Ergebnisse über die Domänenstruktur und den Wirkungsmechanismus von FhIA.

*In vivo*- und *in vitro*-Analysen der C-terminalen Hälfte von FhIA (FhIA-C, Aminosäuren 379 bis 693 von FhIA), welche die Domänen B, C und D von FhIA umfaßt, zeigten, daß dieser Teil von FhIA sämtliche für die Transkriptionsaktivierung und ATP-Hydrolyse benötigten Bereiche enthält. Beide Aktivitäten von FhIA-C sind konstitutiv, bedürfen also nicht mehr der Aktivierung durch Formiat-Bindung. Durch die Bindung von DNA konnte die Aktivität von FhIA-C jedoch gesteigert werden, wobei bei spezifischer DNA ein stärkerer Effekt als bei unspezifischer zu beobachten war. Aus den Ergebnissen wurde ein Modell abgeleitet, in welchem die N-terminale Domäne von FhIA im nicht-induzierten Zustand einen hemmenden Einfluß auf die Aktivität des restlichen Proteins hat. Formiat-Bindung an die N-terminale Domäne hebt diese Hemmung auf und bewirkt eine Steigerung der Aktivität von FhIA durch Erhöhung der Affinität für ATP. Auch die HycA-Suszeptibilität konnte der N-terminalen Domäne zugeordnet werden. Darüberhinaus besitzt die N-terminale Domäne eine strukturelle Funktion, da sie für die Oligomerisierung von FhIA verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung von ATP an FhIA eine Änderung der Konformation oder des Oligomerisierungszustandes des Proteins zur Folge hat.

Eine Studie zur Verbreitung des FhIA-Regulationssystems ergab, daß in mehreren Spezies der Familie Enterobacteriaceae sowohl ein zu FhIA orthologes Protein als auch Homologe zu *hyc*- oder *hyp*-Genen existieren. Die Sequenz von *fhIA* aus *S. typhimurium*, *E. aerogenes* und *K. oxytoca* wurde bestimmt. Sie zeigt über die gesamte Länge große Ähnlichkeit zu FhIA von *E. coli*, wobei der Grad der Identität der Gene und Proteine den phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen entspricht. Die FhIA-Orthologe aus *E. aerogenes* und *K. oxytoca* können FhIA aus *E. coli* funktionell ersetzen und zeigen auch in ihrer Aktivität hinsichtlich der Stimulierbarkeit durch Formiat und Anaerobiose große Übereinstimmung. Desweiteren beeinflusst auch HycA von *E. coli* die Aktivität der orthologen Proteine, was wiederum die nahe Verwandtschaft der Regulationssysteme zeigt.

Im Hauptteil dieser Arbeit konnte der Beweis erbracht werden, daß das HydH/G-Zwei-Komponenten-System die Expression von *zraP* aktiviert, einem stromaufwärts von *hydH* gelegenen, in divergierender Richtung orientierten Gen. Für gereinigtes HydG wurde durch Gelretardationsexperimente und DNase I Footprinting-Analyse eine Bindestelle identifiziert, die im intergenen Bereich zwischen *hydHG* und *zraP* liegt. Diese 55 bp lange Region umfaßt zwei jeweils 17 bp lange Bereiche mit der Sequenz GAGTAAAATGACTCGC, die als inverted repeat angeordnet sind. Diese Bindestelle wirkt als UAS in beide Richtungen. Als auslösender Stimulus für die Expressionsaktivierung von *zraP* durch HydH/G konnte eine  $Zn^{2+}$ -Konzentration im Medium von mehr als 0,5 mM identifiziert werden.  $Pb^{2+}$  war zu einem gewissen Grad in der Lage,  $Zn^{2+}$  in der Funktion als Induktor zu ersetzen, jedoch erfolgte keine Aktivierung durch  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  oder  $Hg^{2+}$ . Gleichzeitig ist HydH/G einer positiven Autoregulation unterworfen, die durch die gleichen Metalle induziert wird. Sowohl für die durch HydH/G induzierte Expression von *zraP* als auch von *hydHG* konnte eine Abhängigkeit von  $\sigma^{54}$  gezeigt werden. Der Einfluß von HydH/G auf die Regulation der Gene für die Hydrogenase 3 tritt entgegen früherer Postulate nur bei Überproduktion des Regulators auf und ist auf "cross-talk" zurückzuführen. Zweidimensionale Gelelektrophorese erbrachte Hinweise auf weitere durch HydG in ihrer zellulären Konzentration beeinflusste Proteine. Obwohl *zraP* im Zusammenhang mit Zink-Toleranz identifiziert worden war, zeigten die Ergebnisse keinen Einfluß von HydH/G oder ZraP auf die Zink-Toleranz der Zellen.

**LITERATURVERZEICHNIS**

- Alex, L. A. und Simon, M. I. (1994). *Trends. Genet.* **10**, 133-138.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Altuvia, S., Zhang, A., Argaman, L., Tiwari, A. und Storz, G. (1998). *EMBO J.* **17**, 6069-6075.
- Andrews, S. C., Berks, B. C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M. A., Golby, P. und Guest, J. R. (1997). *Microbiology* **143**, 3633-3647.
- Appleby, J. L., Parkinson, J. S. und Bourret, R. B. (1996). *Cell* **86**, 845-848.
- Argaman, L. und Altuvia, S. (2000). *J. Mol. Biol.* **300**, 1101-1112.
- Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L. und Brondsted, L. (1997). *J. Bacteriol.* **179**, 2141-2146.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1997). *Current protocols in molecular biology*, J. Wiley & sons, Inc.
- Bagg, A. und Neilands, J. B. (1987). *Biochemistry* **26**, 5471-5477.
- Balch, W. E. und Wolfe, R. S. (1976). *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 781-791.
- Ballantine, S. P. und Boxer, D. H. (1986). *Eur. J. Biochem.* **156**, 277-284.
- Barak, R. und Eisenbach, M. (1992). *Biochemistry* **31**, 1821-1826.
- Barrios, H., Valderrama, B. und Morett, E. (1999). *Nucleic Acids Res.* **27**, 4305-4313.
- Beard, S. J., Hashim, R., Membrillo-Hernandez, J., Hughes, M. N. und Poole, R. K. (1997). *Mol. Microbiol.* **25**, 883-891.
- Begg, Y. A., Whyte, J. A. und Haddock, B. Y. (1977). *FEMS Microbiol. Lett.* **2**, 47-50.
- Belitsky, B. R. und Sonenshein, A. L. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10290-10295.
- Bender, H. (1977). *Arch. Microbiol.* **113**, 49-56.
- Berg, B. L. und Stewart, V. (1990). *Genetics* **125**, 691-702.
- Berg, J. M. und Shi, Y. (1996). *Science* **271**, 1081-1085.
- Bhriain, N. N., Dorman, C. J. und Higgins, C. F. (1989). *Mol Microbiol.* **3**, 933-942.
- Binet, M. R. und Poole, R. K. (2000). *FEBS Lett.* **473**, 67-70.
- Birkmann, A., Sawers, G. und Böck, A. (1987a). *Mol. Gen. Genet.* **210**, 535-542.
- Birkmann, A., Zinoni, F., Sawers, G. und Böck, A. (1987b). *Arch. Microbiol.* **148**, 44-51.
- Birkmann, A. und Böck, A. (1989). *Mol. Microbiol.* **3**, 187-195.
- Blattner, F. R., Plunkett, G. III, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F. *et al.* (1997). *Science* **277**, 1453-1474.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. S. (1987). *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Böhm, R., Sauter, M. und Böck, A. (1990). *Mol. Microbiol.* **4**, 231-243.

- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heynecker, H. L. und Boyer, H. W. (1977). *Gene* **2**, 95-113.
- Bouche, S., Klauck, E., Fischer, D., Lucassen, M., Jung, K. und Hengge-Aronis, R. (1998). *Mol. Microbiol.* **27**, 787-795.
- Bourret, R. B., Borkovich, K. A. und Simon, M. I. (1991). *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 401-441.
- Brocklehurst, K. R., Hobman, J. L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S. J., Brown, N. L. und Morby, A. P. (1999). *Mol. Microbiol.* **31**, 893-902.
- Brondsted, L. und Atlung, T. (1994). *J. Bacteriol.* **176**, 5423-5428.
- Brondsted, L. und Atlung, T. (1996). *J. Bacteriol.* **178**, 1556-1564.
- Buck, M., Gallegos, M. T., Studholme, D. J., Guo, Y. und Gralla, J. D. (2000). *J. Bacteriol.* **182**, 4129-4136.
- Cannon, W. V., Kreutzer, R., Kent, H. M., Morett, E. und Buck, M. (1990). *Nucleic Acids Res.* **18**, 1693-1701.
- Casabadan, M. J. und Cohen, S. N. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4530-4533.
- Csonka, L. N. (1981). *Mol. Gen. Genet.* **182**, 82-86.
- Delgado, A. und Ramos, J. L. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 8059-8062.
- Dixon, R. (1998). *Arch. Microbiol.* **169**, 371-380.
- Dorman, C. J., Barr, G. C., Bhirain, N. N. und Higgins, C. F. (1988). *J. Bacteriol.* **170**, 2816-2826.
- Drummond, M., Clements, J., Merrick, M. und Dixon, R. (1983). *Nature* **301**, 302-307.
- Eisenberg, D., Weiss, R. M. und Terwilliger, T. C. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 140-144.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J. und de Lorenzo, V. (1999). *J. Bacteriol.* **181**, 6223-6229.
- Fernández, S., de Lorenzo, V. und Pérez-Martín, J. (1995). *Mol. Microbiol.* **16**, 205-213.
- Fiedler, G., Pajatsch, M. und Böck, A. (1996). *J. Mol. Biol.* **256**, 279-291.
- Finel, M. (1998). *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 112-121.
- Fisher, S. L., Jiang, W., Wanner, B. L. und Walsh, C. T. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 23143-23149.
- Flashner, Y., Weiss, D. S., Keener, J. und Kustu, S. (1995). *J. Mol. Biol.* **249**, 700-713.
- Forchhammer, K., Rücknagel, K. P. und Böck, A. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 9346-9350.
- Fraenkel, D. G. und Neidhardt, F. C. (1961). *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 96-100.
- Francis, K., Patel, P., Wendt, J. C. und Shanmugam, K. T. (1990). *J. Bacteriol.* **172**, 5750-5757.



- Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M., White, O., Sutton, G. G., Dodson, R., Gwinn, M., Hickey, E. K., Clayton, R., Ketchum, K. A., *et al.* (1998). *Science* **281**, 375-388.
- Friedrich, T. und Scheide, D. (2000). *FEBS Lett.* **479**, 1-5.
- Gest, H. (1954). *Bacteriol. Rev.* **18**, 43-73.
- Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A. und Weiss, W. (1995). *Electrophoresis* **16**, 1079-1086.
- Gross, R., Aricò, B. und Rappuoli, R. (1989). *Mol. Microbiol.* **3**, 1661-1667.
- Hamilton, C. M., Aldea, M., Washburn, B. K., Babitzke, P. und Kushner, S. R. (1989). *J. Bacteriol.* **171**, 4617-4622.
- Hasona, A., Ray, R. M. und Shanmugam, K. T. (1998). *J. Bacteriol.* **180**, 1466-1472.
- Himpens, S., Loch, C. und Supply, P. (2000). *Microbiology* **146**, 3091-3098.
- Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981). *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- Holt, J. G., Ed. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hoover, T. R., Santero, E., Porter, S. und Kustu, S. (1990). *Cell* **63**, 11-22.
- Hopper, S. (1990). Reinigung und Charakterisierung eines Regulatorproteins des fermentativen H<sub>2</sub>-Stoffwechsels von *E. coli*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Hopper, S. (1995). Das Formiat-Regulon von *Escherichia coli*: Untersuchungen zur FhIA-abhängigen Regulation. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Hopper, S., Babst, M., Schlenz, V., Fischer, H. M., Hennecke, H. und Böck, A. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 19597-19604.
- Hopper, S. und Böck, A. (1995). *J. Bacteriol.* **177**, 2798-2803.
- Hopper, S., Kors, I. und Böck, A. (1996). *J. Bacteriol.* **178**, 199-203.
- Hoshino, N., Kimura, T., Yamaji, A. und Ando, T. (1999). *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 1245-1250.
- Huber, A. (1999). HydHG in *Escherichia coli* - ein Zwei-Komponenten-System. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Igo, M. M., Ninfa, A. J., Stock, J. B. und Silhavy, T. J. (1989). *Genes Dev.* **3**, 1725-1734.
- Ishige, K., Nagasawa, S., Tokishita, S. und Mizuno, T. (1994). *EMBO J.* **13**, 5195-5202.
- Iuchi, S. und Lin, E. C. (1993). *Mol. Microbiol.* **9**, 9-15.
- Jacobi, A., Rossmann, R. und Böck, A. (1992). *Arch. Microbiol.* **158**, 444-451.
- Jensen, T. H., Jensen, A. und Kjems, J. (1995a). *Gene* **162**, 235-237.

- Jensen, T. H., Leffers, H. und Kjems, J. (1995b). *J. Biol. Chem.* **270**, 13777-13784.
- Jurnak, F. (1985). *Science* **230**, 32-36.
- King, P. W. und Przybyla, A. E. (1999). *J. Bacteriol.* **181**, 5250-5256.
- Klose, K. E., North, A. K., Stedman, K. M. und Kustu, S. (1994). *J. Mol. Biol.* **241**, 233-245.
- Knappe, J. und Sawers, G. (1990). *FEMS Microbiol. Rev.* **6**, 383-398.
- Korsa, I. (1998). Struktur-Funktionsbeziehungen des Transkriptions-Aktivators FhIA von *Escherichia coli*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Korsa, I. und Böck, A. (1997). *J. Bacteriol.* **179**, 41-45.
- Kox, L. F., Wosten, M. M. und Groisman, E. A. (2000). *EMBO J.* **19**, 1861-1872.
- Kulkarni, R. D. und Summers, A. O. (1999). *Biochemistry* **38**, 3362-3368.
- Kustu, S., North, A. K. und Weiss, D. S. (1991). *Trends Biochem. Sci.* **16**, 397-402.
- Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D. und Weiss, D. (1989). *Microbiol. Rev.* **53**, 367-376.
- Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982). *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, J. H., Scholl, D., Nixon, B. T. und Hoover, T. R. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 20401-20409.
- Leonhartsberger, S. (1997). Die Funktion der N-terminalen Domäne des Regulatorproteins FhIA in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Leonhartsberger, S., Ehrenreich, A. und Böck, A. (2000). *Eur. J. Biochem.* **267**, 3672-3684.
- Leonhartsberger, S., Huber, A., Lottspeich, F. und Böck, A. (2001a). *J. Mol. Biol.* **307**, 93-105.
- Leonhartsberger, S., Korsa, I. und Böck, A. (2001b). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, im Druck.
- Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M. und Stock, J. B. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 718-722.
- Lutz, S., Böhm, A., Beier, A. und Böck, A. (1990). *Mol. Microbiol.* **4**, 13-20.
- Lutz, S., Jacobi, A., Schlensog, V., Böhm, R., Sawers, G. und Böck, A. (1991). *Mol. Microbiol.* **5**, 123-135.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M. und Saito, H. (1994). *Nature* **369**, 242-245.
- Maier, T., Binder, U. und Böck, A. (1996). *Arch. Microbiol.* **165**, 333-341.
- Maloy, S. R., Bohlander, M. und Nunn, W. D. (1980). *J. Bacteriol.* **143**, 720-725.
- Martinez, E., Bartolome, B. und de la Cruz, F. (1988). *Gene (Amst.)* **1**, 159-162.
- Maxam, A. M. und Gilbert, W. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 560-564.
- McCleary, W. R. und Stock, J. B. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 31567-31572.

- Menon, N. K., Chatelus, C. Y., Dervartanian, M., Wendt, J. C., Shanmugam, K. T., Peck, H. D. J. und Przybyla, A. E. (1994). *J. Bacteriol.* **176**, 4416-4423.
- Menon, N. K., Robbins, J., Peck, H. D. J., Chatelus, C. Y., Choi, E. S. und Przybyla, A. E. (1990). *J. Bacteriol.* **172**, 1969-1977.
- Menon, N. K., Robbins, J., Wendt, J. C., Shanmugam, K. T. und Przybyla, A. E. (1991). *J. Bacteriol.* **173**, 4851-4861.
- Merrick, M. J. (1993). *Mol. Microbiol.* **10**, 903-909.
- Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Mills, D. M., Bajaj, V. und Lee, C. A. (1995). *Mol. Microbiol.* **15**, 749-759.
- Mizuno, T. (1997). *DNA Res.* **4**, 161-168.
- Mizuno, T. (1998). *J. Biochem.* **123**, 555-563.
- Mizuno, T., Kaneko, T. und Tabata, S. (1996). *DNA Res.* **3**, 407-414.
- Mizuno, T. und Mizushima, S. (1990). *Mol. Microbiol.* **4**, 1077-1082.
- Möller, W., Schipper, A. und Amons, R. (1987). *Biochimie* **69**, 983-989.
- Morett, E. und Segovia, L. (1993). *J. Bacteriol.* **175**, 6067-6074.
- Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W. und O'Halloran, T. V. (2000). *J. Bacteriol.* **182**, 5864-5871.
- Murray, M. G. und Thompson, W. F. (1980). *Nucleic Acids Res.* **8**, 4321-4325.
- Negishi, T., Fujita, N. und Ishihama, A. (1995). *J. Mol. Biol.* **248**, 723-728.
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L. und Smith, D. F. (1974). *J. Bacteriol.* **119**, 736-747.
- Ng, L. C., O'Neill, E. und Shingler, V. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 17281-17286.
- Nies, D. H. (1992). *Plasmid* **27**, 17-28.
- Ninfa, A. J., Ninfa, E. G., Lupas, A. N., Stock, A., Magasanik, B. und Stock, J. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5492-5496.
- Noll, M., Petrukhin, K. und Lutsenko, S. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 21393-21401.
- O'Farrell, P. H. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- Outten, F. W., Outten, C. E., Hale, J. und O'Halloran, T. V. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 31024-31029.
- O'Neill, E., Ng, L. C., Sze, C. C. und Shingler, V. (1998). *Mol. Microbiol.* **28**, 131-141.
- Pajatsch, M. (1999). Cyclodextrin-Stoffwechsel von *Klebsiella oxytoca*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Parkinson, J. S. (1993). *Cell*, **73**, 857-871.
- Patzer, S. I. und Hantke, K. (1998). *Mol. Microbiol.* **28**, 1199-1210.

- Patzer, S. I. und Hantke, K. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 24321-24332.
- Pavel, H., Forsman, M. und Shingler, V. (1994). *J. Bacteriol.* **176**, 7550-7557.
- Pecher, A., Zinoni, F. und Böck, A. (1985). *Arch. Microbiol.* **141**, 359-363.
- Pecher, A., Zinoni, F., Jatisatienr, C., Wirth, R., Hennecke, H. und Böck, A. (1983). *Arch. Microbiol.* **136**, 131-136.
- Pelton, J. G., Kustu, S. und Wemmer, D. E. (1999). *J. Mol. Biol.* **292**, 1095-1110.
- Perego, M. und Hoch, J. A. (1996). *Trends Genet.* **12**, 97-101.
- Pérez-Martín, J. und de Lorenzo, V. (1995a). *J. Bacteriol.* **177**, 3758-3763.
- Pérez-Martín, J. und de Lorenzo, V. (1995b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9392-9396.
- Pérez-Martín, J. und de Lorenzo, V. (1996a). *J. Mol. Biol.* **258**, 575-587.
- Pérez-Martín, J. und de Lorenzo, V. (1996b). *J. Mol. Biol.* **258**, 562-574.
- Rawlings, N. D. und Barrett, A. J. (1991). *Biochem. J.* **275**, 389-391.
- Reitzer, L. J. und Magasanik, B. (1986). *Cell* **45**, 785-792.
- Rensing, C., Mitra, B. und Rosen, B. P. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14326-14331.
- Richard, D. J., Sawers, G., Sargent, F., McWalter, L. und Boxer, D. H. (1999). *Microbiology* **145**, 2903-2912.
- Romao, M. J., Knablein, J., Huber, R. und Moura, J. J. (1997). *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **68**, 121-144.
- Rombel, I., Peters-Wendisch, P., Mesecar, A., Thorgeirsson, T., Shin, Y. K. und Kustu, S. (1999). *J. Bacteriol.* **181**, 4628-4638.
- Rossmann, R., Maier, T., Lottspeich, F. und Böck, A. (1995). *Eur. J. Biochem.* **227**, 545-550.
- Rossmann, R., Sauter, M., Lottspeich, F. und Böck, A. (1994). *Eur. J. Biochem.* **220**, 377-384.
- Rossmann, R., Sawers, G. und Böck, A. (1991). *Mol. Microbiol.* **5**, 2807-2814.
- Rudolph, J. und Oesterhelt, D. (1996). *J. Mol. Biol.*, **258**, 548-554.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sankar, P., Lee, J. H. und Shanmugam, K. T. (1988). *J. Bacteriol.* **170**, 5440-5445.
- Sauter, M., Böhm, R. und Böck, A. (1992). *Mol. Microbiol.* **6**, 1523-1532.
- Sawers, R. G., Ballantine, S. P. und Boxer, D. H. (1985). *J. Bacteriol.* **164**, 1324-1331.
- Sawers, R. G., Jamieson, D. J., Higgins, C. F. und Boxer, D. H. (1986). *J. Bacteriol.* **168**, 398-404.
- Schlenzog, V. (1993). Genetische Analyse, Struktur und Funktion des Formiat-Hydrogen-Lyase-Aktivatorproteins (FhIA) von *Escherichia coli*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

- Schlenso, V. und Böck, A. (1990). *Mol. Microbiol.* **4**, 1319-1327.
- Schlenso, V., Lutz, S. und Böck, A. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 19590-19596.
- Schumacher, M. M., Enderlin, C. S. und Selitrennikoff, C. P. (1997). *Curr. Microbiol.* **34**, 340-347.
- Schuster, S. S., Noegel, A. A., Oehme, F., Gerisch, G. und Simon, M. I. (1996). *EMBO J.* **15**, 3880-3889.
- Self, W. T., Grunden, A. M., Hasona, A. und Shanmugam, K. T. (1999). *Microbiology* **145**, 41-55.
- Self, W. T. und Shanmugam, K. T. (2000). *FEMS Microbiol. Lett.* **184**, 47-52.
- Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B. P. und Mitra, B. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 3873-3878.
- Shingler, V. (1996). *Mol. Microbiol.* **19**, 409-416.
- Shingler, V. und Pavel, H. (1995). *Mol. Microbiol.* **17**, 505-513.
- Simons, R. W., Houtman, F. und Kleckner, N. (1987). *Gene* **53**, 85-96.
- Singh, K. K. (2000). *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 1043-1050.
- Skärfstad, E., O'Neill, E., Garmendia, J. und Shingler, V. (2000). *J. Bacteriol.* **182**, 3008-3016.
- Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K. *et al.* (1997). *J. Bacteriol.* **179**, 7135-7155.
- Southern, E. M. (1975). *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Stoker, K., Reijnders, W. N., Oltmann, L. F. und Stouthamer, A. H. (1989). *J. Bacteriol.* **171**, 4448-4456.
- Stoyanov, J. V., Hobman, J. L. und Brown, N. L. (2001). *Mol. Microbiol.* **39**, 502-511.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Su, W., Porter, S., Kustu, S. und Echols, H. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5504-5508.
- Suppmann, B. und Sawers, G. (1994). *Mol. Microbiol.* **11**, 965-982.
- Swanson, R. V., Alex, L. A. und Simon, M. I. (1994). *Trends Biochem. Sci.* **19**, 485-490.
- Tabor, S. und Richardson, C. C. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1074-1078.
- Trevors, J. T., Stratton, G. W. und Gadd, G. M. (1986). *Can. J. Microbiol.* **32**, 447-464.
- Urao, T., Miyata, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (2000). *FEBS Lett.* **478**, 227-232.
- Wang, J. T., Syed, A. und Gralla, J. D. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9538-9543.
- Wanner, B. L. (1992). *J. Bacteriol.* **174**, 2053-2058.

Wedel, A. und Kustu, S. (1995). *Genes. Dev.* **9**, 2042-2052.

Weiss, D. S., Batut, J., Klose, K. E., Keener, J. und Kustu, S. (1991). *Cell* **67**, 155-167.

Whitaker, J. R. und Granum, P. E. (1980). *Anal. Biochem.* **109**, 156-159.

Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T. C. und Böck, A. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4650-4654.

Anhang 1: DNA-Sequenz von *fhIA* von *S. typhimurium* und abgeleitete Aminosäuresequenz.

ATGTCGTATA MetSerTyrT	CACCCATGAG hrProMetSe	CGATCTTGG rAspLeuGly	CAGCAAGGCT GlnGlnGlyL	TGTTCGATAT euPheAspIl	CACTCGTACC eThrArgThr	60
TTATTCGACG LeuLeuGlnG	AGCCCGATTT lnProAspLe	GGCGTCGCTC uAlaSerLeu	AGTGAAGCGC SerGluAlaL	TTTCGCAACT euSerGlnLe	GGTAAAGCGT uValLysArg	120
TCAGCGCTCG SerAlaLeuA	CCGACAGCGC laAspSerAl	CGGCATTGTG aGlyIleVal	CTATGGCAGG LeuTrpGlnA	CGCAGTCGCA laGlnSerGl	ACGCGCACAA nArgAlaGln	180
TATTATGCGA TyrTyrAlaT	CGCGAGAAAA hrArgGluAs	TGGCCGTCTT nGlyArgPro	GTGGAATATG ValGluTyrG	AAGATGAAAC luAspGluTh	CGTACTGGCG rValLeuAla	240
CACGCCCGG HisGlyProV	TACGTCGCAT alArgArgIl	CCTTCTCTGC eLeuSerArg	CCCATGCAAT ProAspAlaL	TGCACTGTAA euHisCysAs	TTTCCATGAG nPheHisGlu	300
TTTACCGAAA PheThrGluT	CCTGGCCGCA hrTrpProGl	GCTTGCCCGG nLeuAlaAla	AGCGCCCTCT SerGlyLeuT	ACCCTGAATF yrProGluPh	TGGTCATFAC eGlyHisTyr	360
TGTCIGCTTC CysLeuLeuP	CTTTAGCCGC rdLeuAlaAl	GGAGGGCCGT aGluGlyArg	ATTTTCGGCG IlePheGlyG	GCTGCGAATF lyCysGluPh	CATCCGTCAG eIleArgGln	420
GAAGATCGCC GluAspArgP	CCTGGAGTGA roTrpSerGl	AAAGGAATAT uLysGluTyr	GACCGTCTGC AspArgLeuH	ATACGTTTAC isThrPheTh	CCAAATGTTC rGlnIleVal	480
GGCGTGTTCG GlyValValA	CCGAGCAAA laGluGlnIl	TCAAAACCGG eGlnAsnArg	GTAACAATA ValAsnAsnA	AGTTCGATTA snValAspTy	TGATCTGTTG rAspLeuLeu	540
TGCCCGAAC CysArgGluA	GCGATAACTT rgAspAsnPh	CCGTATCTCG eArgIleLeu	GTTCGGATTA ValAlaIleT	CCAACGCCGT hrAsnAlaVa	CCTGTCCGGT lLeuSerArg	600
CTGGATATTG LeuAspIleA	ATGAACTGGT spGluLeuVa	AAGCGAAGTC lSerGluVal	GCAAAAGAGA AlaLysGluI	TTCAACCTTA leHisHisTy	TTTCAATATC rPheAsnIle	660
GACCGATCA AspAlaIleS	GCATCGTGT erIleValLe	GCGCAGCCAT uArgSerHis	CGCAAAAATA ArgLysAsnL	AGCTGAATAT ysLeuAsnIl	CTACTCCACC eTyrSerThr	720
CACTACCTTG HisTyrLeuA	ATGAGCATCA spGluHisHi	TCCGGCGCAC sProAlaHis	GAACAGAGCG GluGlnSerG	AAGTCGACGA luValAspGl	AGCCGGCAGG uAlaGlyThr	780
CTCAGGAGC LeuThrGluA	GCGTCTTTAA rgValPheLy	AAGTAAAGAG sSerLysGlu	ATGCIGCTTA MetLeuLeuI	TCAACCTCAA leAsnLeuAs	CGAACCGCAT nGluArgAsp	840
CCGCTTGCCC ProLeuAlaP	CCTACGAACG roTyrGluAr	CATGCTGTTC gMetLeuPhe	GATACCTGGG AspThrTrpG	GCAATCAGAT lyAsnGlnIl	CCAGACGCTT eGlnThrLeu	900
TGCCIGCTGC CysLeuLeuP	CGTGTATGTC rdLeuMetSe	CGGCAAGACG rGlyLysThr	ATGCTTGGCG MetLeuGlyV	TGCTCAAAC alLeuLysLe	GGCCAGTGC uAlaGlnCys	960
GAAGAAAAG GluGluLysV	TGTTTACCAC alPheThrTh	CGCCAACCTC rAlaAsnLeu	AAGCTGCTGC LysLeuLeuA	GTCAGATTGC rgGlnIleAl	CGAACGGGTA aGluArgVal	1020

GCCATTGCCG AlaIleAlaV	TGATAATGC alAspAsnAl	GCTGGCCTAT aLeuAlaTyr	CAGGAAATCC GlnGluIleH	ACCGACTGAA isArgLeuLy	GGAACGCTG sGluArgLeu	1080
GTCGACGAAA ValAspGluA	ACCTGGCGCT snLeuAlaLe	CACGGAACAG uThrGluGln	CTTAATAACG LeuAsnAsnV	TCGACAGCGA alAspSerGl	GTTTGGCGAG uPheGlyGlu	1140
ATCATCGGAC IleIleGlyA	GCAGCGAAGC rgSerGluAl	GATGTACAAC aMetTyrAsn	GTGCTAAAGC ValLeuLysG	AGGTTGAGAT lnValGluMe	GGTGGCGCAG tValAlaGln	1200
AGCGACAGTA SerAspSerT	CCGTGCTGAT hrValLeuIl	TCTGGCGGAA eLeuGlyGlu	ACGGAACCG ThrGlyThrG	GTAAAGAGTT lyLysGluLe	GATIGCCCGC uIleAlaArg	1260
GCCATTCACA AlaIleHisA	ACCTGAGCGG snLeuSerGl	ACGTAGCGGG yArgSerGly	CGCAGGATGG ArgArgMetV	TAAAGATGAA allLysMetAs	CTGCGCCGCG nCysAlaAla	1320
ATGCCGGCGG MetProAlaG	GGCTGCTGGA lyLeuLeuGl	AAGCGATCTG uSerAspLeu	TTTGGTCATG PheGlyHisG	AGCGCGCGC luArgGlyAl	GTTTACCGGC aPheThrGly	1380
GCCAGCGCGC AlaSerAlaG	AGCGGATTTG lnArgIleGl	CCGTTTCGAG yArgPheGlu	CTGGCGGATA LeuAlaAspL	AAAGCTCGCT ysSerSerLe	GTTTCTGGAT uPheLeuAsp	1440
GAAGTGGGCG GluValGlyA	ACATGCCGCT spMetProLe	GGAGCTACAG uGluLeuGln	CCTAAGCTGC ProLysLeuL	TGCGCGICTT euArgValLe	TCAGGAGCAA uGlnGluGln	1500
GAGTTTGAAC GluPheGluA	GTCTCGGCAG rgLeuGlySe	CAATAAATCTG rAsnLysLeu	ATCCAGACCG IleGlnThrA	ACGTGCGGCT spValArgLe	GATCGCCGCG uIleAlaAla	1560
ACTAACCGCG ThrAsnArgA	ATCTGAAAAA spLeuLysLy	AATGGTCGCC sMetValAla	GATCGCGAAT AspArgGluP	TCCGTAACGA heArgAsnAs	TCTCTACTAT pLeuTyrTyr	1620
CGGCTGAATG ArgLeuAsnV	TTTTTCCGAT alPheProIl	CCAGCTTCCT eGlnLeuPro	CCGTGCGCG ProLeuArgG	AACGTCCGGA luArgProGl	AGATATTCCA uAspIlePro	1680
CTACTGGTCA LeuLeuValL	AAGCGTTCAC ysAlaPheTh	TTTCAAATC rPheLysIle	GCCCGCCGAA AlaArgArgM	TGGGGCGTAA etGlyArgAs	TATCGACAGC nIleAspSer	1740
ATTCCCGCCG IleProAlaG	AAACGCTGG luThrLeuAr	CACGCTTAGC gThrLeuSer	AGCATGGAAT SerMetGluT	GGCCGGGGAA rpProGlyAs	CGTTCGCGAG nValArgGlu	1800
CTGGAGAATG LeuGluAsnV	TCGTGAGCG alValGluAr	CGCCGIGCTG gAlaValLeu	CTGACGCGCG LeuThrArgG	GCAATGIGCT lyAsnValLe	ACAAC'TGTG uGlnLeuSer	1860
CTGCCGATA LeuProAspI	TTACCGCGT leThrAlaVa	AACGCCGAT lThrProAsp	ACCTCGCCTG ThrSerProV	TTGCGACTGA alAlaThrGl	AAGCGCCAAA uSerAlaLys	1920
GAAGCCGAAG GluGlyGluA	ATGAATATCA spGluTyrGl	GCTTATTATA nLeuIleIle	CGGTGCTGA ArgValLeuL	AAGAGACCAA ysGluThrAs	TGGCGTAGTG nGlyValVal	1980
GCTGGACCAA AlaGlyProL	AAGGCGCGC ysGlyAlaAl	GCAGCGTCTG aGlnArgLeu	GGCTTAAAC GlyLeuLysA	GAACCACCTT rgThrThrLe	GCTGTGCGGT uLeuSerArg	2040
ATGAAGCGAT MetLysArgL	TGGGTATTGA euGlyIleAs	TAAAGACGCG pLysAspAla	TTAGCGTAA LeuAla...			2079



Anhang 2: DNA-Sequenz von *fhIA* von *K. oxytoca* und abgeleitete Aminosäuresequenz.

ATGTCGTATA MetSerTyrT	CACCGATGGG hrProMetGl	CGATCTTGGG yAspLeuGly	CAGCAGGGTC GlnGlnGlyL	TGTTTGATAT euPheAspIl	CACCCGCATT eThrArgIle	60
TTAATTACAGC LeuLeuGlnG	AGCCGGATCT lnProAspLe	GGCCGCGCTG uAlaAlaLeu	AGCGAGACGC SerGluThrL	TGACCGGCCT euThrGlyLe	GGTGCAGCAG uValGlnGln	120
TCCGCGCTCG SerAlaLeuA	CGACCCGGGC laAspArgAl	GGCGATTATT aAlaIleIle	CTGTGGCATT LeuTrpHisS	CCGGCAACCA erGlyAsnHi	TCGCGCGACA sArgAlaThr	180
AGGCACGCCT ArgHisAlaC	GGACGATGC ysAspAspAl	CGGGCATCCG aGlyHisPro	GTGAGCTATG ValSerTyrG	AAGATGAAAC luAspGluTh	CGTCTCGCC rValLeuAla	240
AACGCCCGG AsnGlyProV	TTCGTCGICT alArgArgLe	GCTGTCCCGA uLeuSerArg	CCGGATGCGC ProAspAlaL	TGCATIGCGA euHisCysAs	TAGCGCCACC pSerAlaThr	300
TTTGCCGAGA PheAlaGluT	CCTGGCCGCA hrTrpProGl	GCTGGCCCGA nLeuAlaArg	AGCGGACTCT SerGlyLeuT	ATCCACCTT yrProThrPh	TGGCTATTAC eGlyTyrTyr	360
TGCCITGCTGC CysLeuLeuP	CGTGGCGGC roLeuAlaAl	GGAAGGCCGC aGluGlyArg	ATCTICGGCG IlePheGlyG	GCTGCGAATT lyCysGluPh	CATCCGCGAT eIleArgAsp	420
GACAACCGGC AspAsnArgP	CATGGACTGA roTrpThrGl	AAAAGAGTAC uLysGluTyr	CAGCGGCTGC GlnArgLeuH	ACACTTTTAC isThrPheTh	GCAAATCGTC rGlnIleVal	480
GCCGIGGTGA AlaValValT	CCGAGCAGAT hrGluGlnIl	CCAGAGCCGG eGlnSerArg	GTCAGCAATA ValSerAsnA	ACGTCGATTA snValAspTy	CGACCTGCTG rAspLeuLeu	540
TGCCACGAGC CysHisGluA	GGGATAACTT rgAspAsnPh	CCGCATCCTC eArgIleLeu	GTGGCGATCA ValAlaIleT	CCAACGCCGT hrAsnAlaVa	GCTCTCGGG lLeuSerArg	600
CTGGATATCG LeuAspIleA	ACGAGCTGGT spGluLeuVa	CAGCGAAGTG lSerGluVal	GCCAAAGAGA AlaLysGluI	TCCACCGCTA leHisArgTy	CTTCCGCATC rPheArgIle	660
GATGCCATTA AspAlaIleS	GGTAGTGCT erValValLe	GCGCAGCAAC uArgSerAsn	CGCAAAGGCA ArgLysGlyL	AGCTCAACAT ysLeuAsnIl	CTACTCCACC eTyrSerThr	720
CACTACCTCG HisTyrLeuA	ACGCCAGCCA spAlaSerHi	TCCGGTGCAC sProValHis	GACCAGAGCG AspGlnSerG	AAGTGGATGA luValAspGl	AGCCGGTACC uAlaGlyThr	780
CTGACCAGC LeuThrGluA	GGTCTTCAA rgValPheLy	AAGTAAAGAG sSerLysGlu	ATGCTGCTGC MetLeuLeuL	TCAATCTGCA euAsnLeuHi	CGAGCATGAC sGluHisAsp	840
CCGCTGGCGC ProLeuAlaP	CGTACGAAAA roTyrGluLy	AATGCTTTTC sMetLeuPhe	GAGATGTGGG GluMetTrpA	ATAACAAAAT spAsnLysIl	TCAGACCCTG eGlnThrLeu	900
TGCCITGCTGC CysLeuLeuP	CGTGTATGTC roLeuMetSe	CGGCAATACC rGlyAsnThr	CTGCTCGGG LeuLeuGlyV	TGCTGAAGCT alLeuLysLe	GGCGCAGTGC uAlaGlnCys	960
GATGAGAAAG AspGluLysV	TGTTACACCAC alPheThrTh	CACCAATCTT rThrAsnLeu	AAGCTGCTGC LysLeuLeuA	GGCAAATCGC rgGlnIleAl	CGAGCGCGTC aGluArgVal	1020

TCGATCGCCA SerIleAlaI	TCGACAACGC IleAspAsnAl	CCTCGCCTAC aLeuAlaTyr	CGCGAAATTC ArgGluIleG	AGCGCCTGAA InArgLeuLy	GGAGCGGCTG sGluArgLeu	1080
GTCGATGAGA ValAspGluA	ACCTCGCCCT snLeuAlaLe	GACCGAACAG uThrGluGln	CTCAACAACG LeuAsnAsnV	TGGAGAGCGA alGluSerGl	GTTFGGCGAA uPheGlyGlu	1140
ATCAITGGCC IleIleGlyA	GCAGCGAGGC rgSerGluAl	GATGAACAGC aMetAsnSer	GIGCTCAACG ValLeuLysG	AGGTGGAGAT InValGluMe	GGTGGCGCAC tValAlaHis	1200
AGCGACAGCA SerAspSerT	CGGTGCTGAT hrValLeuIl	CCTCGGCGAA eLeuGlyGlu	ACCGGCACCG ThrGlyThrG	GTAAGGAGCT lyLysGluLe	GATFGCCCGC uIleAlaArg	1260
GCTAITCATA AlaIleHisA	ATCTGAGCGG snLeuSerGl	CCGCAATAGC yArgAsnSer	CGCGGATGG ArgArgMetV	TCAAAATGAA alLysMetAs	CTGCGGCGC nCysAlaAla	1320
ATGCCCGCCG MetProAlaG	GGCTGCTGGA lyLeuLeuGl	AAGCGACCTG uSerAspLeu	TTTGGCCACG PheGlyHisG	AGCGCGCGC luArgGlyAl	CTTACCGGT aPheThrGly	1380
GCCAGCGCGC AlaSerAlaG	AGCGTATCGG InArgIleGl	CCGTTTCGAA yArgPheGlu	CTGGCGGACA LeuAlaAspL	AAAGCTCGCT ysSerSerLe	GTTFCTCGAT uPheLeuAsp	1440
GAAGTGGCG GluValGlyA	ATATGCCGGT spMetProVa	GGAGCTGCAG lGluLeuGln	CGAAGCTGC ProLysLeuL	TGCGCGTCTT euArgValLe	GCAGGAGCAG uGlnGluGln	1500
GAGTTCGAGC GluPheGluA	GTCTCGGCAG rgLeuGlySe	CAATAAGCTG rAsnLysLeu	ATTACACCG IleHisThrA	ACGTGGCCTT spValArgLe	GATCGCCGCG uIleAlaAla	1560
ACCAACCGCG ThrAsnArgA	ATCTTAAGCA spLeuLysGl	GATGGTCGCC nMetValAla	GATCGCGAAT AspArgGluP	TTCGCAGCGA heArgSerAs	TCCTACTAT pLeuTyrTyr	1620
CGGCTGAACG ArgLeuAsnV	TCCTCCCGAT alPheProIl	CCACCTGCCG eHisLeuPro	CGCTGCGCG ProLeuArgG	AGCGGCCGGA luArgProAs	CGATATCCG pAspIlePro	1680
CTGCTGGTGA LeuLeuValL	AGGCTTTCAC ysAlaPheTh	CTTTAAATC rPheLysIle	GCCCGCCGTC AlaArgArgL	TGGGACGCAA euGlyArgAs	TAICGACAGC nIleAspSer	1740
ATTCGGCGCG IleProAlaG	AAACGCTGGC luThrLeuAr	CCTTCTCAGC gLeuLeuSer	CGCATGGAGT ArgMetGluT	GGCCGGGCAA rpProGlyAs	CGTGGCTGAG nValArgGlu	1800
CTGAAAACG LeuGluAsnV	TCATGAGCG alIleGluAr	CGCGGTGCTG gAlaValLeu	CTGACCCGCG LeuThrArgG	GCAGCGTCTT lySerValLe	GCAGCTCTCC uGlnLeuSer	1860
TTGCCGGAAA LeuProGluM	TGAACATCGA etAsnIleGl	GCCGAGCCG uProGlnPro	CTGGCGGCAG LeuAlaAlaG	AAGTGTGCC luValLeuPr	GGAGGAAGGC oGluGluGly	1920
GAAGATGAAT GluAspGluT	ACCAGCTGAT yrGlnLeuIl	TGTCGGGTG eValArgVal	CTGAAAGACA LeuLysGluS	GCAACGCGT erAsnGlyVa	GGTCCCGGA lValAlaGly	1980
CCGAAGGGCG ProLysGlyA	CGGCCAGCG laAlaGlnAr	TCGGGATTA gLeuGlyLeu	AAGCGCACCA LysArgThrT	CTTTGCTTTC hrLeuLeuSe	GCCATGAAA rArgMetLys	2040
CGGTGGGCA ArgLeuGlyI	TTCATAAAGA leHisLysAs	CCAGCTGCAG pGlnLeuGln	TAG			2073

Anhang 3: DNA-Sequenz von *fhIA* von *E. aerogenes* und abgeleitete Aminosäuresequenz.

ATGTGCTATA MetSerTyrT	CACCAATGGG hrProMetGl	CGATCTCGGG yAspLeuGly	CAGCAGGGTC GlnGlnGlyL	TGTTTGATAT euPheAspIl	CACCCGTATT eThrArgIle	60
TTATTACAGC LeuLeuGlnG	AGCCCAGTCT lnProAspLe	GGCCGCGCTG uAlaAlaLeu	AGCGAAACGC SerGluThrL	TAACCCGTCT euThrArgLe	GGTGCAGCAA uValGlnGln	120
TCCGCGCTTG SerAlaLeuA	CGACCGGGC laAspArgAl	GGGATTATC aAlaIleIle	TTGTGGAACC LeuTrpAsnH	ACGGCAACCA isGlyAsnHi	TCGCGCCGCC sArgAlaAla	180
AGGTACGCCT ArgTyrAlaC	GGGACGACGC ysAspAspAl	CGGGCAGCCG aGlyGlnPro	GCAAGCTACG AlaSerTyrG	AAGATGAAAC luAspGluTh	CGTACTGGCG rValLeuAla	240
CACGGCCCGG HisGlyProV	TACGCCGCCT alArgArgLe	GCTGTCCGGC uLeuSerArg	CCCAGCGCGC ProAspAlaL	TACATTGCCA euHisCysAs	CAACGTGACC pAsnValThr	300
TTCCGCCAAA PheAlaGluT	CCTGGCCGCA hrTrpProGl	GCTGGCCGCC nLeuAlaAla	AGCGGCATTT SerGlyIleT	ACCCGGAATT yrProGluPh	CGGCTACTIAC eGlyTyrTyr	360
TGCCTGCTGC CysLeuLeuP	CGCTGGCCGC roLeuAlaAl	GGAAGGCCGC aGluGlyArg	ATCTTCGGCG IlePheGlyG	GTTGTGAGTT lyCysGluPh	CATCCGCCAC eIleArgAsp	420
GACAACCGGC AspAsnArgP	CATGGAGCGA roTrpSerGl	AAAAGAGTAC uLysGluTyr	CAGCGCCTGC GlnArgLeuH	ATACTTTCCG isThrPheAl	GCAGATTGTC aGlnIleVal	480
GCCGTCGTGA AlaValValT	CGGAGCAGAT hrGluGlnIl	CCAAAGCCGG eGlnSerArg	GTCAGCAACA ValSerAsnA	ACGTCGATT snValAspTy	CGACCTGCTG rAspLeuLeu	540
TGCCACGAGC CysHisGluA	GGGATAACTT rgAspAsnPh	CCGCATCCTG eArgIleLeu	GTGGCCATCA ValAlaIleT	CCAACGCCGT hrAsnAlaVa	CCTGTCCGGC lLeuSerArg	600
CTCGATATTG LeuAspIleA	ACGAGCTGGT spGluLeuVa	CAGCGAGGTG lSerGluVal	GCGAAAGAGA AlaLysGluI	TCCACCGCTA leHisArgTy	TTTCCGCATC rPheArgIle	660
GACGCCATCA AspAlaIleS	GGTGGTGCT erValValLe	GCGCAGCAAC uArgSerAsn	CGCAAAGGCA ArgLysGlyL	AGCTTAACAT ysLeuAsnIl	CTACTCTACC eTyrSerThr	720
CACTATCTCG HisTyrLeuA	AGCCAGCCA spAlaSerHi	TCCGGTCCAC sProValHis	GACCAAAGCG AspGlnSerG	AAGTCGATGA luValAspGl	AGCCGGCAGC uAlaGlyThr	780
CTAACCAGAC LeuThrGluA	GGGTGTTTAA rgValPheLy	GAGCAAAGAG sSerLysGlu	ATGCTGTTAC MetLeuLeuL	TCAATCTGCA euAsnLeuHi	TGAGCACCAC sGluHisAsp	840
TCGCTGGCCG SerLeuAlaP	CGTATGAGAA roTyrGluLy	AATGCTCTTC sMetLeuPhe	GAGATGTGGG GluMetTrpA	ATAACCAGAT spAsnGlnIl	CCAGACCCTG eGlnThrLeu	900
TGCCIGTTGC CysLeuLeuP	CGCTCATGTC roLeuMetSe	CGGCAATACG rGlyAsnThr	CTGCICGGGG LeuLeuGlyV	TACTTAAGCT alLeuLysLe	GGCGCAGTGC uAlaGlnCys	960
GATGAACAAG AspGluGlnV	TATTTACCAC alPheThrTh	CACCAACCTT rThrAsnLeu	AAACTGCTGC LysLeuLeuA	GGCAAATCGC rgGlnIleAl	CGAGCGCGTA aGluArgVal	1020

TCGATAGCTA SerIleAlaI	TCGATAATGC leAspAsnAl	CCTCGCCTAC aLeuAlaTyr	CGCGAGATCC ArgGluIleG	AGGTCTTGAA lnArgLeuLy	AGAACGGCTG sGluArgLeu	1080
GTGGATGAAA ValAspGluA	ACCTGGCGCT snLeuAlaLe	CACTGAACAG uThrGluGln	CTCAACAACG LeuAsnAsnV	TCGAAAGCGA alGluSerGl	GTTCGGCGAA uPheGlyGlu	1140
ATCATCGGTC IleIleGlyA	GCAGCGAAGC rgSerGluAl	GATGCACAGC aMetHisSer	GTGCTTAAAC ValLeuLysG	AGGTGGAGAT lnValGluMe	GGTGGCGCAG tValAlaGln	1200
AGCGACAGTA SerAspSerT	CGGTGCTGAT hrValLeuIl	CCTCGGTGAA eLeuGlyGlu	ACCGCACCG ThrGlyThrG	GTAAGGAACT lyLysGluLe	GATTGCCCGC uIleAlaArg	1260
GCTATTCATA AlaIleHisA	ACCTGAGCGG snLeuSerGl	GCGCAACGGC yArgAsnGly	CGGCGATGG ArgArgMetV	TGAAAATGAA alLysMetAs	CTGCGCGGG nCysAlaAla	1320
ATGCCCGCGG MetProAlaG	GCCTGCTGGA lyLeuLeuGl	AAGCGATCTG uSerAspLeu	TTTCGCCACG PheGlyHisG	AGCGCGGCGC luArgGlyAl	TTTTACCGGC aPheThrGly	1380
GCCAGCGCCC AlaSerAlaG	AGGCATCGG lnArgIleGl	CGTTTCGAA yArgPheGlu	CTAGCGGACA LeuAlaAspL	AAAGCTCGCT ysSerSerLe	GTTCCTCGAT uPheLeuAsp	1440
GAGGTCGGCG GluValGlyA	ATATGCCGCT spMetProLe	GGAACTGCAG uGluLeuGln	CCGAAGCTGC ProLysLeuL	TGCGGTTTCT euArgValLe	CCAGGAGCAG uGlnGluGln	1500
GAATTCGAAC GluPheGluA	GTCTGGGCAG rgLeuGlySe	CAATAAACTG rAsnLysLeu	ATTCAGACCG IleGlnThrA	ATGTACGGCT spValArgLe	GATAGCCGCC uIleAlaAla	1560
ACCAACCGCG ThrAsnArgA	ATCTCAAACA spLeuLysGl	GATGGTTATC nMetValIle	GATCGIGAAT AspArgGluP	TCCGAGCGA heArgSerAs	TCTTTACTAT pLeuTyrTyr	1620
CGGCTCAATG ArgLeuAsnV	TGTTCCCGAT alPheProIl	CCACCTGCCG eHisLeuPro	CCGCTGCGCG ProLeuArgG	AAGCCCGGA luArgProAs	CGATATTCCA pAspIlePro	1680
CTGCTGGTGA LeuLeuValL	AAGCAITCAC ysAlaPheTh	TTTCAAATC rPheLysIle	GCCC GCCGTC AlaArgArgL	TGGGGCGCAA euGlyArgAs	CATCGACAGT nIleAspSer	1740
ATTCCCGCGG IleProAlaG	AGACCCTGCG luThrLeuAr	CACGCTTTCG gThrLeuSer	CGCATGGAGT ArgMetGluT	GGCCGGCAA rpProGlyAs	CGTGCGGAG nValArgGlu	1800
CTGGAAAACG LeuGluAsnV	TCGTGAGCG alValGluAr	CGCGGTGTG gAlaValIleu	TTGACCCGCG LeuThrArgG	GCAACGTACT lyAsnValLe	GCAACTGTG uGlnLeuSer	1860
CTGCCGAAA LeuProGluM	TGCATAITGA etHisIleGl	ACAGGAGACG uGlnGluThr	CTGGCCCGG LeuAlaProG	AAGTGCTGCC luValLeuPr	GGAGGAAGCC oGluGluGly	1920
GAAGATGAAT GluAspGluT	ATCAGCTGAT yrGlnLeuIl	CGTCCGGGTA eValArgVal	CTGAAAGAGA LeuLysGluS	GCAACGGCGT erAsnGlyVa	GGTGGCCGGG lValAlaGly	1980
CCAAAAGGCG ProLysGlyA	CCGCCAGCG laAlaGlnAr	CCTGGGGCTC gLeuGlyLeu	AAGCGCACGA LysArgThrT	CGCTGCTGTC hrLeuLeuSe	GCGCATGAAG rArgMetLys	2040
CGTTTAGGCA ArgLeuGlyI	TTAATAAGGA leAsnLysAs	TGGTTAGTIC pArgLeuVal	TAG ...			2073

**Anhang 4:** Sequenz des *hydHG*-Bereichs aus dem Genom von *K. oxytoca*. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *hydH* (Base289 bis 1677) und *hydG* (Base 1674 bis 3002), sowie der vermutliche Anfang von *zraP* (Base 37 bis 1) ist eingezeichnet. Die Kästen kennzeichnen die putativen  $\sigma^{54}$ -Promotoren.

CAATCAGCGT elIueLrhT	CAGCGICATT ueLrhTteMs	TTTTTGTTC yLsyLnsAgr	GTTTCATAGT AsyLteM	TTATTTCICCT	GICTTATGGT	60
TACTCAGTGA	TTTGGCATTCTT	CCGTGCCAGA	GTTGAAAGGC	CGCAGGATAT	CGGGCGTTGA	120
ATGCTTTTCA	GCGGACGGGA	GCGAGTAAAA	ATGACTCGCG	GTAAGGACG	CAGCGGTICA	180
TTTTTACTCG	ATCGCCTTCC	CGGTTTGC	CCAGGGAGAG	GTTAGATGGG	ACGGAATAGT	240
GGCATGATTT	CTGCCTGGCT	ATGGGGTGTC	TCAGGAAAGG	GAGTTGICAT Me	GAACGTGATG tAsnValMet	300
CGTTTGCTTA ArgLeuSerL	AGGATTCGGT ysAspSerVa	CGCGTTGGG lAlaValGly	CTGAGCTGGT LeuSerTrpL	TGTTAACCGG euLeuThrGl	CCTTATCTTG yLeuIleLeu	360
CTGCTGGTAT LeuLeuValC	GCCTGTTTTC ysLeuPheSe	CGCTTTAATC rAlaLeuIle	GTCGGTACT ValArgAspT	ATGGCCGTGA yrGlyArgGl	AAATGAAGCC uAsnGluAla	420
GACGCCAGA AlaArgGlnT	CTATCCAGGA hrIleGlnGl	AAAAGGCAGC uLysGlySer	GTCCTGATTC ValLeuIleA	GCGCTCTTGA rgAlaLeuGl	GTCCGGAACC uSerGlyThr	480
CGGGTCGGAA ArgValGlyM	TGGGAATGCG etGlyMetAr	CATGCATCAT gMetHisHis	TCCAGTTGC SerGlnLeuG	AGACGCTGCT lnThrLeuLe	GGAGGAGATG uGluGluMet	540
GCCTGGCAGC AlaTrpGlnP	CCGGCGTACT roGlyValLe	GTTGTTCCGG uTrpPheAla	GTCACGGATG ValThrAspG	AGAACGGTAA luAsnGlyLy	AATTATCGCC sIleIleAla	600
CATAGCGACC HisSerAspP	CGCGGGGGT roArgArgVa	CGTGGAGTCG lGlyGluSer	CTCTATCCTG LeuTyrProA	CCAGCACCTT laSerThrLe	GCGGGAGCTG uArgGluLeu	660
AATATCGGTA AsnIleGlyS	GCGAGGAGCG erGluGluAr	CTGGCGCCGC gTrpArgArg	CTCGAACAAAC LeuGluGlnP	CGGAGCCGGC roGluProAl	GCTGGAGATT aLeuGluIle	720
TATCGTCAGT TyrArgGlnP	TTCGCCCCT heArgProLe	TAAGGGCGGC uAsnGlyGly	GGCATCATA GlyHisHisM	TGCGCATGAT etArgMetMe	GATGCGTCGC tMetArgArg	780
GAATCTGCCG GluSerAlaA	ATCTGGGTAA spLeuArgAs	TCAGGCGCCC nGlnAlaPro	CAGGTCATTT GlnValIleP	TTATTGCCTT heIleAlaPh	TGATACCCGC eAspThrArg	840
GAGCTGGATG GluLeuAspA	CCGACCATGC laAspHisAl	TCGTTGGCTG aArgGlyLeu	CGCAATATGG ArgAsnMetV	TCATTATGCT alIleMetLe	CTGCGCGGCA uCysAlaAla	900
GGCGTGGTGA GlyValValM	TGGCAGCAAC etAlaAlaTh	GGTGTGGCG rValLeuAla	CAGTTCTGGT GlnPheTrpP	TCCGCCCTA heArgArgTy	TCAGGTTTCA rGlnArgSer	960
CGCAAGCAGC ArgLysGlnL	TGCAGGAGGC euGlnGluAl	GACGCGCGA aThrAlaArg	AAAGAAAAGC LysGluLysL	TGGTGGCGCT euValAlaLe	CGGTATCTG uGlyHisLe	1020

GCCGCGGGG AlaAlaGlyV	TCGCCATGA alAlaHisGl	AATCCGCAAC uIleArgAsn	CCGCTATCAT ProLeuSerS	CCATAAAAGG erIleLysGl	GCTGGCCAAG yLeuAlaLys	1080
TATTTTCGCCG TyrPheAlaG	AGCGAACCC luArgThrPr	AGCCGATGGT oAlaAspGly	GAAGCGCATC GluAlaHisG	AGCTGGCTCT lnLeuAlaLe	GGTGATGGCC uValMetAla	1140
ACAGAAGCCG ArgGluAlaA	ATCGCCTGAA spArgLeuAs	CAGGGTCGTC nArgValVal	AGCGAGCTGC SerGluLeuL	TGGAAGTGGT euGluLeuVa	GCGTCCGGCG lArgProAla	1200
CATTTAAAAT HisLeuLysT	ATCAATCGGT yrGlnSerVa	TGATTTAAAAT lAspLeuAsn	GAAGTGATCA GluValIleT	CGCATTTCGCT hrHisSerLe	TCAACTGGTT uGlnLeuVal	1260
AGCCAGGATG SerGlnAspA	CCGCCAGCG laAlaSerAr	GGCAATATCT gAlaIleSer	CTGACGTTTA LeuThrPheT	CGCGCAGCC hrAlaGlnPr	CGCGCTAIGC oAlaLeuCys	1320
CCCATCCAGG ArgIleGlnA	CCGATCCGGA laAspProAs	TCGTTTGAAA pArgLeuLys	CAGGTGCTGC GlnValLeuL	TTAACCTTTA euAsnLeuTy	TCTCAATGCT rLeuAsnAla	1380
GTCATGCCA ValHisAlaI	TTGGCCGCGA leGlyArgGl	GGGCGTGATT uGlyValIle	ACGGTGGCGG ThrValAlaV	TCAGGGAGTG alArgGluCy	CGGCGATGGG sGlyAspGly	1440
CGAGTCAAGG ArgValLysV	TGAGCGTTGC alSerValAl	TGACAGCGGC aAspSerGly	AAGGGAATGA LysGlyMetT	CGGCGGAACA hrAlaGluGl	GCTACAGGCC nLeuGlnAla	1500
ATTTTCACAC IlePheThrP	CGTACTTTAG roTyrPheSe	TACCAAGGCC rThrLysAla	GACGCACCG AspGlyThrG	GGCTGGGCCT lyLeuGlyLe	GGCGGTGGTG uAlaValVal	1560
CAGAACATCG GlnAsnIleV	TTGAGCAGCA alGluGlnHi	CGGCGGACA sGlyGlyThr	ATTGACGCCG IleAspAlaG	AGAGCGCCCC luSerAlaPr	CGGCAAGGGC oGlyLysGly	1620
GGCTATTTTA AlaLeuPheT	CGTTCTAITTT hrPheTyrLe	GCCGGTTAAT uProValAsn	GGGCAACAGA GlyGlnGlnL	AGGATGAACA ysAspGluGl	AGGATGAGTG nGly... MetSerG	1680
GGGAGCAGGT lyGluGlnVa	CGATATTCIG GGGCTGGGGT	GTTGGTGACG ValValAspA	ATGACATTAG spAspIleSe	CCACTGCACT rHisCysThr	ATCTTACAGG IleLeuGlnA	1740
CGCTGTTCGG laLeuLeuAr	gGlyTrpGly CGAGAAGGIC	TTTGGATCTGG TyrArgValA	TGCTTTGCCA laLeuAlaAs	TATTCGCATG nAsnGlyLeu	GCGGAGATGG GlnAlaLeuG	1800
luLysValAr ACGGCATCGA	gGluLysVal AAGCTAAAA	PheAspLeuV GAGATCAAAA	alLeuCysAs CCTTCAATCC	pIleArgMet GTCGATTCCC	AlaGluMetA GTTCTGAICA	1860
spGlyIleGl TGACCGCGTA	uThrLeuLys CTCCAGCGTT	GluIleLysT GATACGCTG	hrPheAsnPr TAGAGGCGCT	oSerIlePro GAAATCCGGT	ValLeuIleM GCGCTGGACT	1920
etThrAlaTy ACCTTATTAA	rSerSerVal GCCGCTGGAC	AspThrAlaV TTTGACAAGC	alGluAlaLe TGCAGCTGAC	uLysSerGly GCTATCCGAG	AlaLeuAspT GCGTTGGCC	1980
ylLeuIleLy ACACCCGGCT	sProLeuAsp AAGCGAGTCT	PheAspLysL CCCGTCACAG	euGlnLeuTh AGACCCCGC	rLeuSerGlu CGCCAGITTT	AlaLeuAlaH GGTATGGTGG	2040
isThrArgLe	uSerGluSer	ProValThrG	luThrProAl	aAlaGlnPhe	GlyMetValG	2100

GGGATAGCCC	GCCGATGCGG	GCGCTGCTGA	ACAATAATCAC	CCTGGTTGCG	CCCTCCGATG	2160
lyAspSerPr CGACGGTATT	oAlaMetArg AATTCACGGC	AlaLeuLeuA GAGTCGGCA	snAsnIleTh CAGGGAAGA	rLeuValAla GCTGGTCGCG	ProSerAspA CGAGCGCTGC	2220
laThrValLe ACGCCAGCAG	uIleHisGly CGCTCGCAGC	GluSerGlyT CGCAGGCCG	hrGlyLysGl TGGTATCCT	uLeuValAla CAACTGTGCG	ArgAlaLeuH GCGCTCAACG	2280
isAlaSerSe AGTCGTGCT	rAlaArgSer GGAGTCGGAG	ArgArgProL CTGTTTGCC	euValIleLe ATGAGAAGG	uAsnCysAla CGCGTTTACC	AlaLeuAsnG GGTGGCAGCA	2340
luSerLeuLe AACGCCGAGA	uGluSerGlu AGGGCGCTTC	LeuPheGlyH GTTGAAGCG	isGluLysGl ACGGCGGTAC	yAlaPheThr GCTGTTCCCT	GlyAlaAspL GATGAGATAG	2400
ysArgArgGl GCGACATTT	uGlyArgPhe GCCGTTGATG	ValGluAlaA CAGGTGCCC	spGlyGlyTh TGCTGCGGG	rLeuPheLeu GATTCAGGAG	AspGluIleG CGCGAAGTGC	2460
lyAspIleSe AGCGGTGGG	rProLeuMet CAGCAACCAG	GlnValArgL ACCCTTTGG	euLeuArgAl TTGACGTACG	aIleGlnGlu GCTGATTGCC	ArgGluValG GCCACCCATC	2520
lnArgValGl GGGATTTAGC	ySerAsnGln CGAAGAGGTC	ThrLeuSerV AGCGCCGGAC	alAspValAr GTTTTGCCA	gLeuIleAla GGATCTCTAC	AlaThrHisA TACCGTTTGA	2580
rgAspLeuAl ACGTCGTGAC	aGluGluVal TATCGACATG	SerAlaGlyA CCGCCGCTGC	rgPheArgGl GTCATCGCAG	nAspLeuTyr GGAGGATATC	TyrArgLeuA CCCCCGCTGG	2640
snValValTh CGCGCTATTT	rIleAspMet CCTGCAACGG	ProProLeuA TATGCCGAGC	rgHisArgAr GTAACCGCAA	gGluAspIle AGCGGTACAG	ProProLeuA GGATTTAGGC	2700
laArgTyrPh CACAGGCGAT	eLeuGlnArg GGACTTGCTG	TyrAlaGluA ATTCACTACG	rgAsnArgLy CCTGGCCGGG	sAlaValGln CAATATTCGC	GlyPheThrP GAGCTGGAAA	2760
roGlnAlaMe ATGCGGTGGA	tAspLeuLeu GCGGGCGGTG	IleHisTyrA GTCCTGCTGA	laTrpProGl CCGGCGAGTA	yAsnIleArg CATCTCCGAA	GluLeuGluA CGCGAGCTGC	2820
snAlaValGl CGCTGGCGAT	uArgAlaVal TACCGTACG	ValLeuLeuT CCGTTTGGG	hrGlyGluTy ACGCGCCGCA	rIleSerGlu CGGCGATGAT	ArgGluLeuP AGTATTCAGC	2880
roLeuAlaIl CGCTGGTGA	eThrGlyThr GGTGGAGAAA	ProValAlaA GAAGCGATT	spAlaProHi TGCGGCACT	sGlyAspAsp TGAAAGAACC	SerIleGlnP GGCGGCAACA	2940
roLeuValGl AAACTGAAGC	uValGluLys CGCCCGTGG	GluAlaIleL TTAGGCATTA	euAlaAlaLe CGCGAAAAC	uGluArgThr GCTGCTGGCA	GlyGlyAsnL AAGCTCAGCC	3000
ysThrGluAl GTTAGCGGTT	aAlaArgArg TTGCTCACGT	LeuGlyIleT TCGATAGCG	hrArgLysTh GCCAGCCGAT	rLeuLeuAla GTCGTTACCG	LysLeuSerA CTAAAGCTGC	3060
rg CGTCCCAGCT	GATATCGCT					3079

**Anhang 5:** Sequenzvergleich von HydH von *E. coli* und *K. oxytoca* mit NtrB von *E. coli*.

Aminosäuren, die in allen drei Proteinen identisch sind, sind durch Rahmen hervorgehoben, ähnliche Aminosäuren durch graue Schattierung. Das P kennzeichnet das Histidin, das in NtrB das Substrat der Autophosphorylierung ist. Die Balken zeigen die putativen Transmembranbereiche in HydG an.

NtrB E.c.	M-----	-----	-----	-----	--ATGTOP--	7
HydH E.c.	MRFMQRSKDS	LAKWLSAILP	VVIVGLVGLF	AVTVIRDYGR	ASEADROALL	50
HydH K.o.	MNVMRLSKDS	VAVGLSWLLT	GLILLLVCLF	SALIVRDYGR	ENEAAARQTIQ	50
NtrB E.c.	DAGQIL-----	-----	-----NSL	IN-----SI	L---LIDDN-	26
HydH E.c.	EKGNVLIRAL	ESGSRVGMGM	RMHHVQQQAL	LEEMAGQPGV	LWFAVTDAG	100
HydH K.o.	EKGSVLIRAL	ESGTRVGMGM	RMHHSQLOTL	LEEMAWQPGV	LWFAVTDENG	100
NtrB E.c.	-LAIH-----	-----YANPA	AQQL-LAQSS	R-KLFGTPL-	-PELLSY--F	59
HydH E.c.	IIIIHSDPDK	VGRALYSPDE	MOKLKPEENS	RWRLLGKTET	TPALEVYRLF	150
HydH K.o.	KIIAHSDPRR	VGESLYPAST	LRELNIGSEE	RWRRLQOPE-	-PALEIYRQF	148
NtrB E.c.	-SLN---IEL	MOESLE-AGQ	GFT--DNEVT	LVIIDGRSHIL	SVTAQR-MPD	101
HydH E.c.	QPMSAPWRHG	MHNMPRCNGK	AVPOVDAQQA	IFIAVDASDL	VATQSGEKRN	200
HydH K.o.	RPLNGG-GHH	MRMMMRRESA	DLRN-QAPOV	IFIAFDTREL	DADHARGLRN	196
NtrB E.c.	GMILL-EMAP	M-----	-----DNQRR	LSQEQLOHAQ	Q-VAARDLVR	135
HydH E.c.	TLIIILFALAT	VLLASVLSFF	WYRRYLRSRQ	LLODEMKRKE	KLVALGHLAA	250
HydH K.o.	MVIMLCAAGV	VMAATVLAQF	WFRRYQRSRK	QLOEATARKE	KLVALGHLAA	246
	(P)					
NtrB E.c.	GLAHEIKNPL	GGLRGAQQL	S-KALPDPSL	LEYTKVIIIEQ	ADRLRNLDVR	184
HydH E.c.	GVAHEIFNPL	SSIKGLAKYF	AERAPAGGEA	HQLAQVMAKE	ADRLNRVNSE	300
HydH K.o.	GVAHEIFNPL	SSIKGLAKYF	AERTPADGEA	HQLALVMARE	ADRLNRVNSE	296
NtrB E.c.	LLGQILPGTR	VTESI--HKV	AERVVTLVSM	E-LPDNVRLI	RDYDPSLPPEL	231
HydH E.c.	LLELVKPTHL	ALQAVDLNLT	INHSLQLVSO	DANSREIQLR	FTANDTLPEI	350
HydH K.o.	LLELVKPAHL	KYQSVDLNEV	ITHSLQLVSO	DAASRAISLT	FTAQPALCRI	346
NtrB E.c.	AHDPDQIEQV	LLNIVRNALQ	ALGPEGGEIII	LRTRTAFQLT	LHGERYRLAA	281
HydH E.c.	QADPDRLTQV	LLNLYINAIQ	AIGQHGV-IS	VTASESGAG-	VKISVTDGSK	398
HydH K.o.	QADPDRLKQV	LLNLYINAVH	AIGREGV-IIT	VAVRECGDGR	VKVSVDGSK	395
NtrB E.c.	RIDVEDNGPG	IHPHLQDTLF	YPMVSGREGG	TGLGLSIARN	LIDQHSQKIE	331
HydH E.c.	GIAADQLDAI	FTIPYFTTKAE	GTGLGLAVVH	NIVEQHGGTI	QVASQEGKGS	448
HydH K.o.	GMTAEQLQAI	FTIPYFSTKAD	GTGLGLAVVQ	NIVEQHGGTI	DAESAPGKGA	445
NtrB E.c.	FTSWPGHTEF	SVYLPPIRK				349
HydH E.c.	TFTLWLPVNI	TRKDP-QG				465
HydH K.o.	LFTFYLPVNG	QQKDE-QG				462



**Anhang 6:** Sequenzvergleich von HydG von *E. coli* und *K. oxytoca* mit NtrC von *E. coli*.

Aminosäuren, die in allen drei Proteinen identisch sind, sind durch Rahmen hervorgehoben, ähnliche Aminosäuren durch graue Schattierung. Das P kennzeichnet das Aspartat, das in NtrC das Substrat der Phosphorylierung ist.

NtrC <i>E.c.</i>	M- <b>QRGI</b> -VWV <b>VDDDS</b> SIRWV <b>LERALAGAGL</b> TCTTFENGAE <b>VLEALASKTP</b>	48
HydG <i>E.c.</i>	MTHDNIDILV <b>VDDDIS</b> HCTI <b>LOALLRGWGY</b> NVALANSGRQ <b>ALEQVREQVF</b>	50
HydG <i>K.o.</i>	MSGEQVDILV <b>VDDDIS</b> HCTI <b>LOALLRGWGY</b> RVALANNGLQ <b>ALEKVREKVF</b>	50
	Ⓟ	
NtrC <i>E.c.</i>	<b>DVLLSDIRMP</b> <b>GMDGLALLKQ</b> <b>IKQRHPMLPV</b> <b>IIMTAHSOLD</b> <b>AAVSAYOOGA</b>	98
HydG <i>E.c.</i>	<b>DLVLCDIRMA</b> <b>EMDGIATLKE</b> <b>IKALNPAIPV</b> <b>LIMTAYSSVE</b> <b>TAVEALKTGA</b>	100
HydG <i>K.o.</i>	<b>DLVLCDIRMA</b> <b>EMDGIETLKE</b> <b>IKTFNPSIPV</b> <b>LIMTAYSSVD</b> <b>TAVEALKSGA</b>	100
NtrC <i>E.c.</i>	<b>FDYLPKPFDI</b> <b>DEAVALVERA</b> <b>ISHYQEQQP</b> <b>RNVQLNGPTT</b> <b>DIIGEAPAMQ</b>	148
HydG <i>E.c.</i>	<b>LDYLIKPLDF</b> <b>DNLQATLEKA</b> <b>LAHTHSIDAE</b> <b>-TPAVTASQF</b> <b>GMVGKSPAMQ</b>	149
HydG <i>K.o.</i>	<b>LDYLIKPLDF</b> <b>DKLQTLSEA</b> <b>LAHTRLSESP</b> <b>-VTETPAAQF</b> <b>GMVGDSPAMR</b>	149
NtrC <i>E.c.</i>	<b>DVFRIIGRLS</b> <b>RSSISV</b> LING <b>ESGTGKELVA</b> <b>HALHRHSPRA</b> <b>KAPFIALNMA</b>	198
HydG <i>E.c.</i>	<b>HLLSEIALVA</b> <b>PSEATV</b> LIHG <b>DSGTGKELVA</b> <b>RAIHASSARS</b> <b>EKPLVTLNCA</b>	199
HydG <i>K.o.</i>	<b>ALLNNITLVA</b> <b>PSDATV</b> LIHG <b>ESGTGKELVA</b> <b>RALHASSARS</b> <b>RRPLVILNCA</b>	199
NtrC <i>E.c.</i>	<b>AIPKDLIESE</b> <b>LFGHEKGAFT</b> <b>GANTI</b> ROGRF <b>EQADGGTLFL</b> <b>DEIGDMPLDV</b>	248
HydG <i>E.c.</i>	<b>ALNESLIESE</b> <b>LFGHEKGAFT</b> <b>GADKR</b> REGRF <b>VEADGGTLFL</b> <b>DEIGDISPMM</b>	249
HydG <i>K.o.</i>	<b>ALNESLIESE</b> <b>LFGHEKGAFT</b> <b>GADKR</b> REGRF <b>VEADGGTLFL</b> <b>DEIGDISPLM</b>	249
NtrC <i>E.c.</i>	<b>QIRLLRVLAD</b> <b>GQFYRV</b> GGYA <b>PVKVDVRLIA</b> <b>ATHONLEQRV</b> <b>QEGKFR</b> EDLF	298
HydG <i>E.c.</i>	<b>QVRLLR</b> AIQE <b>REVORV</b> GSNQ <b>IISVDVRLIA</b> <b>ATHRDL</b> AAEV <b>NAGRFR</b> ODLY	299
HydG <i>K.o.</i>	<b>QVRLLR</b> AIQE <b>REVORV</b> GSNQ <b>TLSVDVRLIA</b> <b>ATHRDL</b> AAEV <b>SAGRFR</b> ODLY	299
NtrC <i>E.c.</i>	<b>HRLN</b> IVRHL <b>PPLR</b> ERREDI <b>PRLARH</b> FLOV <b>AAREL</b> GVEAK <b>LLHP</b> ETEAL	348
HydG <i>E.c.</i>	<b>YRLN</b> VVAIEV <b>PSLR</b> ORREDI <b>PLL</b> AGHFLOV <b>FAERN</b> RKAVK <b>GFT</b> PQAMDLL	349
HydG <i>K.o.</i>	<b>YRLN</b> VVTIDM <b>PPLR</b> HRREDI <b>PPL</b> ARYFLOV <b>YAERN</b> RKAVQ <b>GFT</b> PQAMDLL	349
NtrC <i>E.c.</i>	<b>TRL</b> AWPGNMR <b>Q</b> ENITCRWLT <b>VMAAG</b> QEVLI <b>QDLP</b> GELFES <b>TVAEST</b> SQMQ	398
HydG <i>E.c.</i>	<b>I</b> HYDWPGNIR <b>E</b> LENAVERAV <b>VLLT</b> GGEYISE <b>REL</b> P--L--- <b>AI</b> AST----	389
HydG <i>K.o.</i>	<b>I</b> HYAWPGNIR <b>E</b> LENAVERAV <b>VLLT</b> GGEYISE <b>REL</b> P--L--- <b>AI</b> TGT----	389
NtrC <i>E.c.</i>	<b>P</b> DSWATLLAQ <b>WADRAL</b> RSQH <b>Q</b> NLLSEAOPE <b>L</b> ERTLLTIAL <b>RHT</b> OGHKQEA	448
HydG <i>E.c.</i>	<b>P</b> ---IP-LGQ <b>-S</b> QD-I---- <b>Q</b> PLV----- <b>E</b> VEKEVILAAL <b>EKT</b> GGNKTEA	424
HydG <i>K.o.</i>	<b>P</b> ---VADAPH <b>-G</b> DDSI---- <b>Q</b> PLV----- <b>E</b> VEKEAILAAL <b>ERT</b> GGNKTEA	426
NtrC <i>E.c.</i>	<b>A</b> RLLGWRNT <b>L</b> TRKLFELGM <b>E</b>	469
HydG <i>E.c.</i>	<b>A</b> ROLGITRKT <b>L</b> ---LAKLSR <b>-</b>	441
HydG <i>K.o.</i>	<b>A</b> RRLGITRKT <b>L</b> ---LAKLSR <b>-</b>	443



## DANKSAGUNG

Natürlich ist auch diese Arbeit nicht ohne fremde Hilfe entstanden, daher möchte ich hier allen danken, die in irgendeiner Art und Weise zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben:

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. August Böck bedanken, für die intensive Betreuung dieser Arbeit, seine fortwährende Unterstützung und die vielen Dinge, die ich bei ihm lernen konnte.

Erich Fritsche aus der Arbeitsgruppe Robert Huber vom Max-Planck-Institut für Biochemie danke ich für die Kristallisation von HydG, auch wenn wir beide das Pech hatten, daß die Kristalle keine Streuung zeigten.

Eva Zehelein danke ich für die Bereitstellung von gereinigtem FhIA und C. A. Lee für Cosmid pDL8-1.

Bei meiner Diplomandin Andrea Huber möchte ich mich dafür bedanken, daß ich in ihr wenigstens neun Monate lang eine Mitstreiterin auf dem HydH/G-Projekt hatte, und daß man sich auf ihre Ergebnisse immer verlassen konnte. Anette Bauer habe ich es zu verdanken, daß ich nicht alle Expressions- und Löslichkeitsstudien mit FhIA<sub>Ea</sub> und FhIA<sub>Ko</sub> selbst machen mußte.

Und natürlich geht ein besonders großer Dank an alle gegenwärtigen und früheren Kollegen, die mich mit ihren guten Tips und ihrer Hilfsbereitschaft unterstützt haben und die viele Zeit, die wir zusammen verbracht haben, oft auch auf nicht-wissenschaftlicher Ebene zu einem Erlebnis werden ließen. Vor allem Danke! an Tobi für die guten Diskussionen, an Martin, der mit seinem fast unerschöpflichen Wissen und Ideenreichtum immer zur Stelle war, wenn man ihn brauchte, und an Mike, für die Abwechslung im Labor und seine vielen provokativen Fragen.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihr Verständnis, besonders natürlich Olle und Jan.

# Lebenslauf

## Angaben zur Person:

Name: Susanne Barbara Leonhartsberger  
Geburtsdatum: 11. März 1972  
Geburtsort: München  
Familienstand: ledig  
Eltern: Gerda Leonhartsberger, Hausfrau  
Roman Leonhartsberger, selbständiger Kaufmann

## Ausbildung:

1978-1982 Grundschole an der Rothpletzstraße, München  
1982-1991 Maximiliansgymnasium München, Abitur  
1991-1997 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität  
München, Diplom  
1997-2001 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für  
Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München  
unter der Leitung von Prof. Dr. A. Böck