



**Regulation des Säure-induzierten Cad-Systems von
Escherichia coli durch den membranintegrierten
Transkriptionsaktivator CadC und die Lysin-spezifische
Permease LysP**

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

von
Christiane Koller
München, im Februar 2008

Promotionsgesuch eingereicht am 21. Februar 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 28. April 2008

1. Gutachter

Professor Dr. Kirsten Jung

Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie,

Ludwig-Maximilians-Universität

München

2. Gutachter

Professor Dr. Dirk Schüler

Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie,

Ludwig-Maximilians-Universität

München

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	16
2.3 Kultivierungsverfahren	18
2.3.1 Induktion und Aktivität des Cad-Systems	19
2.3.2 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems	19
2.3.3 Charakterisierung von <i>E. coli</i> MG1655- <i>lysP211</i>	20
2.3.4 Einfluss von Lysin auf die <i>cadBA</i> -Expression	20
2.3.5 Charakterisierung von <i>E. coli</i> MG1655- <i>lysP-G153S</i>	21
2.3.6 Analyse des Einflusses von CadC-C208A und CadC-C272A auf die <i>cadBA</i> - Expression	21
2.3.7 Co-Expression von <i>cadC/lysP</i> bzw. <i>cadC1-215/lysP</i>	21
2.3.8 Hemmung der <i>cadBA</i> -Expression durch Cadaverin	22
2.3.9 Kultivierung zur Überproduktion von Proteinen	22
2.3.10 Dauerkulturen	23
2.4 Molekularbiologische und genetische Methoden	23
2.4.1 Plasmidisolierung	23
2.4.2 Isolierung von chromosomaler DNA	23
2.4.3 Modifikation von DNA	23
2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA	23
2.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	24
2.4.6 DNA-Sequenzanalyse	24
2.4.7 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung	25
2.4.8 Präparation kompetenter Zellen und Transformation	25
2.4.9 Plasmidkonstruktion	25
2.4.10 Stammkonstruktion	27
2.4.11 Isolierung von RNA	27
2.4.12 Denaturierende Gelelektrophorese	28
2.4.13 Northern Blot Analyse	28
2.4.14 Markierung von DNA	29

2.5 Biochemische und analytische Methoden	30
2.5.1 Präparation von Membranvesikeln und Cytosol.....	30
2.5.2 Reinigung von Proteinen	31
2.5.2.1 Reinigung von Thioredoxin-CadC188-512 bzw. Thioredoxin- CadC188-512-R265C.....	31
2.5.2.2 Abspaltung von Thioredoxin durch Thrombin.....	31
2.5.2.3 Reinigung von CadC188-512 für Kristallisationsversuche.....	32
2.5.2.4 Solubilisierung und Reinigung von CadC für Kristallisationsversuche.....	32
2.5.2.5 Solubilisierung und Reinigung von LysP.....	33
2.5.2.6 Reinigung von RavA und ViaA	34
2.5.3 Rekonstitution von CadC und LysP	34
2.5.4 Proteinbestimmung.....	34
2.5.5 Markierungsversuche mit PEG-Maleimid.....	35
2.5.6 Quervernetzungsstudien	35
2.5.7 SDS-PAGE, Färbung von Proteinen und Berechnung von R_f -Werten.....	36
2.5.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen	36
2.5.9 DNA-Bindeexperimente	37
2.5.10 Tryptophanfluoreszenz	37
2.5.11 Isothermale Titrationskalorimetrie	38
2.5.12 β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung.....	39
2.5.13 Lysin-Decarboxylase-Aktivitätsbestimmung	39
2.5.14 Bestimmung der extrazellulären Cadaverin-Konzentration.....	40
2.6 Mathematische Modellierung des Cad-Systems.....	40
3. Ergebnisse	41
3.1 Transkriptions- und Translationsanalyse des Cad-Systems von <i>E. coli</i>	41
3.1.1 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in <i>E. coli</i> MG1655 (Wildtyp)	41
3.1.2 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in einem <i>lysP</i> -negativen <i>E. coli</i> MG1655..	43
3.1.2.1 Isolierung von <i>E. coli</i> MG1655- <i>lysP211</i>	44
3.1.2.2 Phänotypische Charakterisierung von <i>E. coli</i> MG1655- <i>lysP211</i>	45
3.1.2.3 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in <i>E. coli</i> MG1655- <i>lysP211</i>	46
3.1.3 RavA, ein Transkriptionsaktivator des Cad-Systems?.....	48
3.1.3.1 Transkriptions- und Translationsanalyse des Cad-Systems in <i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ravA</i>	48
3.1.3.2 Versuche zur DNA-Bindung von RavA und ViaA	51
3.1.4 Mathematische Modellierung des Cad-Systems.....	52

3.1.4.1	Entwicklung eines mathematischen Modells des Cad-Systems von <i>E. coli</i> MG1655.....	53
3.1.4.2	Entwicklung eines Modells für <i>E. coli</i> MG1655- <i>lysP211</i> und <i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ravA</i>	55
3.2	Reizwahrnehmung durch CadC	57
3.2.1	Affinität von CadC für Lysin.....	57
3.2.1.1	Produktion und Reinigung der periplasmatischen Domäne	57
3.2.1.2	Analyse der Lysin-Affinität von CadC188-512 mittels Tryptophanfluoreszenz..	59
3.2.1.3	Bestimmung der Affinität von CadC188-512-R265C für Lysin.....	61
3.2.1.4	Direkte Bestimmung der Lysin-Affinität von CadC mittels ITC	62
3.2.2	Einfluss der externen Lysin-Konzentration auf das Cad-System <i>in vivo</i>	64
3.2.2.1	Abhängigkeit der <i>cadBA</i> -Expression von der externen Lysin-Konzentration	64
3.2.2.2	Abhängigkeit der <i>cadBA</i> -Expression von der externen Lysin-Konzentration bei Überproduktion von LysP	66
3.2.3	Cadaverin als Signal für die periplasmatische Domäne von CadC.	67
3.2.3.1	Veränderung der Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512 durch Cadaverin...	67
3.2.3.2	Veränderung der Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512-R265C	69
3.2.3.3	Hemmung der <i>cadBA</i> -Expression durch Cadaverin <i>in vivo</i>	70
3.3	Interaktion von CadC mit der Lysin-spezifischen Permease LysP	72
3.3.1	<i>in vivo</i> Analyse der Interaktion von LysP mit CadC und CadC1-215	72
3.3.2	<i>in vitro</i> Versuche zur Interaktion von CadC und LysP.....	75
3.3.3	Hemmung der <i>cadBA</i> -Expression durch ein Transport-inaktives <i>lysP</i> -Derivat	76
3.4	Versuche zur Strukturaufklärung von CadC.....	80
3.4.1	Versuche zur Kristallisation von CadC188-512	80
3.4.1.1	Trennung von Thioredoxin und CadC188-512 mit Hilfe von Gelfiltration	81
3.4.1.2	Kristallisation von CadC188-512 und Messung am Synchrotron	83
3.4.2	Nachweis einer Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne von CadC	84
3.4.2.1	PEG-Maleimid-Markierung von freien Cysteinen in CadC188-512.....	84
3.4.2.2	Mobilität von reduziertem bzw. oxidiertem CadC188-512 im SDS-Gel	86
3.4.2.3	Einfluss von Reduktionsmittel auf die Cadaverin-Bindung	87
3.4.2.4	Physiologische Rolle der Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne.....	88
3.4.3	Optimierung der Reinigung von CadC	90
3.4.3.1	Reinigung von CadC über Affinitätschromatographie und Gelfiltration	90

4. Diskussion	93
4.1 Transkriptions- und Translationsanalyse des Cad-Systems von <i>E. coli</i>	93
4.1.1 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in <i>E. coli</i> MG1655 (Wildtyp)	93
4.1.2 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in <i>E. coli</i> MG1655- <i>lysP211</i>	94
4.1.3 RavA und/oder ViaA aktivieren die <i>cadBA</i> -Expression.....	96
4.1.4 Mathematische Modellierung des Cad-Systems	97
4.2 Reizwahrnehmung durch CadC	101
4.2.1 CadC weist nur eine niedrige Affinität für Lysin auf	101
4.2.2 Einfluss der Lysin-Konzentration auf die <i>cadBA</i> -Expression <i>in vivo</i>	103
4.2.3 Die periplasmatische Domäne von CadC ist ein Cadaverin-Sensor	104
4.3 Interaktion von CadC mit der Lysin-spezifischen Permease LysP	105
4.3.1 Interaktion von LysP mit CadC und CadC1-215	105
4.3.2 <i>in vitro</i> Versuche zur Interaktion von CadC und LysP.....	106
4.3.3 Lysin-Transport und regulatorische Funktion von LysP sind nicht gekoppelt.....	107
4.4 Modell der Aktivierung und Inaktivierung des Cad-Systems in <i>E. coli</i>..	108
4.5 Versuche zur Strukturaufklärung von CadC.....	112
4.5.1 Versuche zur Kristallisation von CadC188-512	113
4.5.1.1 Nachweis einer Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne von CadC...	114
4.5.2 Optimierung der Reinigung von CadC	117
4.6 Ausblick.....	117
5. Zusammenfassung.....	121
6. Literatur.....	124

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (10^{-10} m)
A_x	Absorption der Wellenlänge x nm
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp ^R	Plasmid-vermittelte Ampicillin-Resistenz
ACP	<i>Acid Shock Protein</i>
AR	<i>Acid Resistance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATR	<i>Acid Tolerance Response</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cadaverin	1,5-Diaminopentan
cal	Kalorie
cfu	<i>colony forming units</i>
Ci	Curie
Cm ^R	Plasmid-vermittelte Chloramphenicol-Resistenz
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle
C-terminal	carboxylterminal
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>

evtl.	eventuell
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GABA	γ -Aminobuttersäure
h	Stunde(n)
Hepes	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
Kan ^R	Plasmid-vermittelte Kanamycin-Resistenz
kDa	Kilodalton
K _D	Dissoziations-/Bindungskonstante
K _A	Assoziationskonstante
K _M	Michaelis-Konstante
L	Liter
LDAO	Lauryldimethylaminoxid
M	Molar (Mol pro Liter)
m	milli- bzw. Meter
μ	mikro-
min	Minute(n)
MOPS	<i>N</i> -Morpholinopropansulfonat
n	nano-
Ni ²⁺ -NTA	Ni ²⁺ -Triazetonitril
N-terminal	aminoterminal
OD ₆₀₀	Optische Dichte der Wellenlänge 600 nm
oNPG	ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG-Maleimid	o-(2-Maleimidoethyl)-o'-methyl-polyethylenglycol 5'000
PLP	Pyridoxalphosphat
PMF	Protonenmotorische Kraft
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sog.	sogenannt
SSC	Standard-Saline-Citrat
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin
TG	Tris/HCl-Glycerol
Thiosin ^R	Thiosin-Resistenz
TM	Transmembrandomäne
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Trx	Thioredoxin A (<i>Escherichia coli</i>)
U	Unit
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Nomenklatur

Genprodukte von *cadC* und *lysP* werden so beziffert, dass das erste Methionin im Wildtyp-Protein in der Aminosäuresequenz mit „1“ bezeichnet wird. Positionen in Proteinen werden als Zahlen hinter der jeweiligen Aminosäure aufgeführt. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben.

CadC und CadC-Derivate besitzen einen N-terminalen Histidin-*Tag*, der über eine *linker*-Sequenz mit dem ersten Methionin im Protein verbunden ist. LysP und LysP-Derivate besitzen einen C-terminalen Histidin-*Tag*, der sich direkt an das Protein anschließt. RavA und ViaA weisen einen N-terminalen Histidin-*Tag* auf, der über eine *linker*-Sequenz mit dem ersten Methionin im Protein verbunden ist. Das Vorhandensein des Histidin-*Tag* wird nicht extra in der Proteinbezeichnung aufgeführt.

Substitutionen im Genprodukt werden so bezeichnet, dass zuerst die native Aminosäure und deren Position genannt werden, anschließend ist die Aminosäuresubstitution angegeben.

Basenaustausche in Genen sind so dargestellt, dass die angegebene Zahl der Position der veränderten Base entspricht.

Im Zusammenhang mit Genbezeichnungen nicht kursiv dargestellte Ziffern beziehen sich auf die Position der Aminosäure im Genprodukt.

„Lysin“ steht immer für L-Lysin, „Alanin“ steht für L-Alanin.

Als Zusatz in Wachstumsmedien wurde L-Lysin Monohydrochlorid verwendet, als Ligand bei den Affinitätsmessungen wurde die freie Base von L-Lysin eingesetzt.

1. Einleitung

Säurestress in Enterobakterien

Enterobakterien, zu denen u. a. die Gattungen *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* und *Yersinia* zählen, gehören zu den neutrophilen Mikroorganismen und bevorzugen ein Medium mit einem neutralen pH-Wert. Dennoch sind Enterobakterien in der Lage, bei pH-Werten im Bereich von 5–9 einen internen pH-Wert im Bereich zwischen 7,4 und 7,8 aufrechtzuerhalten. Diese pH-Homöostase ist für die Stabilität und Funktion von verschiedenen Makromolekülen, aber vor allem auch für die Aufrechterhaltung eines pH-Gradienten über die cytoplasmatische Membran wichtig (Padan *et al.*, 1976; Slonczewski *et al.*, 1981; Zilberstein *et al.*, 1984). Der pH-Gradient ist essentieller Bestandteil der protonenmotorischen Kraft (PMF), welche wiederum für z. B. Nährstofftransport, Rotation der Flagellen oder Bildung von ATP nötig ist.

Enterobakterien sind als Kommensale oder als Pathogene des Gastrointestinaltraktes von Säugetieren auf dem Weg in den Darm zwangsläufig mit den extrem niedrigen pH-Werten des Magens konfrontiert. Diese saure Umgebung (pH 1,5–2,5) ist ein wichtiger Schutz des Wirts vor dem Eindringen von Krankheitserregern. Während aber z. B. ein Überleben des Pathogens *Vibrio cholerae* im Magen vor allem von der Infektionsdosis abhängt, gibt es in Enterobakterien aktive Mechanismen, um sich vor Säurestress zu schützen (Slonczewski und Foster, 1996). Säurestress wird zum einen durch mineralische Substanzen hervorgerufen, wie z. B. die in der Magensäure vorkommende Salzsäure, zum anderen aber auch durch schwache organische Säuren, z. B. Essigsäure oder Propionsäure, wie sie im Intestinaltrakt von Säugetieren vorhanden sind. Da Säuren nur im ungeladenen Zustand über die Cytoplasmamembran diffundieren können, stellt Salzsäure vor allem ein Problem bei sehr niedrigen pH-Werten (pH 1–2) dar. Unter diesen Bedingungen liegt Salzsäure größtenteils undissoziiert, also ungeladen vor. Schwache organische Säuren sind bei einem externen pH-Wert von pH 4–5 protoniert und können in dieser ungeladenen Form in das Cytoplasma diffundieren. Da im Cytoplasma ein neutraler pH-Wert vorliegt, dissoziieren die Säuren, was eine Veränderung des internen pH-Wertes und vor allem den Abbau des Protonengradienten zur Folge hat. Eine rasche Reaktion der Mikroorganismen auf diese ungünstigen Bedingungen ist somit notwendig.

Schutz vor Säurestress in *E. coli*

Grundsätzlich ist die Cytoplasmamembran impermeabel gegenüber geladenen Substanzen und ist somit ein wichtiger passiver Säureschutzmechanismus. Des Weiteren besitzt das Cytoplasma eine gewisse Pufferkapazität, was auch ein Absinken des internen pH-Wertes verhindert. Die Pufferkapazität ist v. a. durch Nukleinsäuren und Proteine, aber auch durch hohe Konzentrationen an Glutamat und Polyaminen gewährleistet. Außerdem können Protonen aktiv über H⁺-translozierende ATPasen aus der Zelle geschleust werden. Da sich durch dieses Ausschleusen ein immer größeres Membranpotential aufbaut, das einen weiteren Protonentransport nach außen verhindert, wird das Membranpotential durch den Transport von positiven Ladungen in die Zelle wieder verringert. Hierbei sind die K⁺-Transportsysteme TrkG, TrkH oder Kup involviert (Bakker und Mangerich, 1981; Dosch *et al.*, 1991; Rhoads *et al.*, 1976; White *et al.*, 1992; Abb. 1). Durch diese Mechanismen der pH-Homöostase ist *E. coli* in der Lage, bei wechselnden externen pH-Werten zwischen 5 und 9 den internen pH-Wert sehr schnell wieder auf pH 7,4 bis 7,8 einzustellen. Dies deutet darauf hin, dass die Komponenten der pH-Homöostase konstitutiv reguliert sind (Slonczewski *et al.*, 1981; Zilberstein *et al.*, 1984).

Während der Magenpassage ist *E. coli* jedoch mit extrem niedrigen pH-Werten konfrontiert. Unter diesen Bedingungen können die konstitutiv exprimierten pH-Homöostase-Systeme diese pH-Werte nicht mehr kompensieren. Die Expression von zahlreichen Genen, die bei niedrigen pH-Werten induziert werden, bildet die Grundlage der Säureresistenz in *E. coli*.

Grundsätzlich lassen sich drei Formen der Säureresistenz (AR, *Acid Resistance*) unterscheiden. Bei AR1 handelt es sich um das oxidative (und Glucose-reprimierte) System, das in der stationären Phase induziert wird und abhängig von σ^S und z. T. vom zyklischen AMP-Rezeptor-Protein CRP ist. AR2 besteht aus der Arginin-Decarboxylase AdiA und dem Arginin/Agmatin-Antiporter AdiC und wird durch einen niedrigen pH-Wert, anaerobe Bedingungen und Arginin induziert. AR3 benötigt bei einem pH-Wert von 2 extrazelluläres Glutamat und wird zu Beginn der stationären Wachstumsphase induziert. Es besteht aus den beiden isoformen Glutamat-Decarboxylasen GadA und GadB und dem putativen Glutamat/GABA-Antiporter GadC (Castanie-Cornet *et al.*, 1999). *E. coli* besitzt somit drei überlappende Systeme, die Schutz vor Säurestress unter verschiedenen externen Bedingungen in der stationären Phase gewährleisten.

In der logarithmischen Wachstumsphase ist für eine volle Ausprägung der Säureresistenz eine Prä-Adaptation an einen niedrigen, aber nicht tödlichen pH-Wert im Bereich von 5-6 notwendig (Goodson und Rowbury, 1989). Nach dieser Adaptation kann *E. coli* unter

Umständen mehrere Stunden einen pH-Wert von 1,5 überleben. Wichtig für diese Säure-Toleranz (ATR, *Acid Tolerance Response*) ist die Synthese von sog. Säure-Schock-Proteinen (ACP, *Acid Shock Proteins*), welche unter der Kontrolle der Regulatorproteine RpoS, Fur und PhoP dem Schutz und der Reparatur von Makromolekülen dienen, aber auch für den Abbau von z. B. aggregierten Proteinen wichtig sind (Bearson *et al.*, 1997; Abb. 1). Einige dieser Gene kodieren für DNA-bindende Proteine wie DPS oder für Chaperone wie HdeA oder HdeB (Gajiwala und Burley, 2000; Tucker *et al.*, 2002), die andere Makromoleküle vor den negativen Auswirkungen eines niedrigen pH-Wertes schützen können. Insgesamt konnten 160 Gene identifiziert werden, die bei niedrigen pH-Werten verstärkt induziert werden (Maurer *et al.*, 2005), doch nur wenige davon wurden bisher genau charakterisiert.

Zu den am besten untersuchten Säureschutz-Systemen gehören die pH-induzierten, degradativen Aminosäure-Decarboxylase-Systeme, nämlich das Gad-System, das Adi-System, das Cad-System und das Spe-System (Gale und Epps, 1942; Gale, 1946; Abb. 1). Das gemeinsame Prinzip besteht darin, dass bei der Decarboxylierung der jeweiligen Aminosäure ein Proton verbraucht wird und das jeweils entstehende Amin über ein Antiporter-System nach außen transportiert wird. Dadurch werden Protonen aus dem Cytoplasma entfernt und der extrazelluläre pH-Wert durch das basische Amin angehoben. Da verschiedene Aminosäure-Decarboxylasen optimale Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten aufweisen, ist eine Anpassung der Zellen über einen weiten pH-Bereich gewährleistet. Das am besten charakterisierte System ist wahrscheinlich das zur AR3 gehörende Glutamat-abhängige Gad-System. Hierbei gibt es die beiden cytoplasmatischen Decarboxylasen GadA und GadB mit einem pH-Optimum bei 4 (Richard und Foster, 2004), GadC ist der membranständige Antiporter, welcher die bei der Decarboxylierung gebildete γ -Aminobuttersäure (GABA) nach außen und gleichzeitig Glutamat nach innen transportiert (Hersh *et al.*, 1996). Das Gad-System ist komplex reguliert, wobei mindestens 11 regulatorische Proteine beteiligt sind, u. a. GadE, GadX und GadW. Bei Eintritt der Zelle in die stationäre Wachstumsphase wird das Gad-System durch den Regulator GadX induziert (Ma *et al.*, 2002). Unter bestimmten Bedingungen kann das Gad-System auch in der logarithmischen Wachstumsphase bei einem niedrigen externen pH durch den Regulator GadE unter der Kontrolle von σ^{70} aktiviert werden (Ma *et al.*, 2003). Die Bedeutung der einzelnen Regulatoren hängt von den jeweiligen Wachstumsbedingungen der Zellen ab.

Das zur AR2 gehörende Adi-System ist ein Arginin-abhängiges System, welches weniger komplex reguliert wird. Es besteht aus *adiA*, das für die Arginin-Decarboxylase AdiA kodiert (Stim und Bennett, 1993), und stromaufwärts von *adiC* liegt, das für einen Arginin/Agmatin-

Antiporter kodiert (Iyer *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2003). Das Adi-System wird in Komplexmedium unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart eines niedrigen pH-Wertes aktiviert. Das pH-Optimum der Arginin-Decarboxylase liegt bei pH 5 (Richard und Foster, 2004). Die Regulation des Adi-Systems ist nicht genau geklärt. Sowohl GadE (Hommais *et al.*, 2004) als auch das Genprodukt des *adiY*-Locus (Stim-Herndon *et al.*, 1996) und CysB (Shi und Bennett, 1994) könnten eine regulatorische Funktion haben.

Das Spe-System (Ornithin-Decarboxylase-System) existiert nur in einigen *E. coli*-Stämmen, nicht jedoch in den K12-Stämmen, doch scheint dieses für das Überleben der Zelle bei externen pH-Werten, die niedriger als 3 sind, keine wichtige Rolle zu spielen (Applebaum *et al.*, 1977).

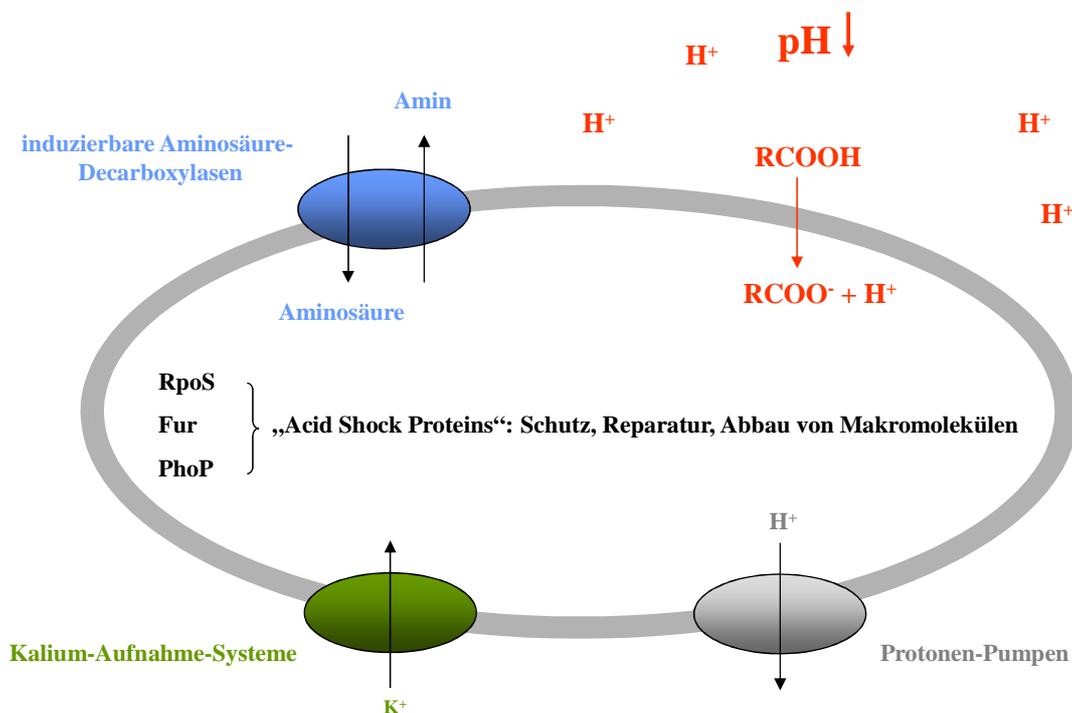


Abb. 1: Säureschutz in *E. coli*

Säureschutz in *E. coli* besteht zum einen aus passiven Mechanismen, zu denen die Impermeabilität der Cytoplasmamembran für Protonen und die Pufferkapazität des Cytoplasmas zählen, zum anderen gibt es aktive Mechanismen. Zu diesen gehören das Ausschleusen von H^+ -Ionen durch Protonen-Pumpen (bei gleichzeitiger K^+ -Aufnahme) und die Synthese verschiedener Proteine, die andere Makromoleküle schützen, reparieren oder abbauen. Einen wichtigen Schutz bieten die Säure-induzierten Aminosäure-Decarboxylase-Systeme Gad, Adi und Cad.

Das Cad-System von *E. coli*

Das Lysin-abhängige Cad-System von *E. coli* setzt sich aus der cytoplasmatischen Lysin-Decarboxylase CadA, dem membrangebundenen Cadaverin/Lysin-Antiporter CadB und dem membranintegralen Transkriptionsaktivator CadC zusammen (Sabo *et al.*, 1974; Auger *et al.*, 1989; Meng und Bennett, 1992a,b; Watson *et al.*, 1992; Abb. 2). Das *cadBA*-Operon ist auf dem Chromosom von *E. coli* bei 93,7 min lokalisiert und wird bicistronisch abgelesen (Auger *et al.*, 1989; Meng und Bennett, 1992a). Das Operon steht unter der Kontrolle des Promotors P_{Cad}, der Transkriptionsaktivator ist CadC. Das *cadC*-Gen liegt auf dem Chromosom von *E. coli* unmittelbar stromaufwärts des *cadBA*-Operons und ist konstitutiv exprimiert (Watson *et al.*, 1992). Die Expression des *cadBA*-Operons wird durch einen niedrigen externen pH-Wert und einen Überschuss an Lysin induziert. Unter anaeroben Bedingungen ist die *cadBA*-Expression ca. 10mal stärker als unter aeroben Bedingungen (Sabo *et al.*, 1974). Für die Expression des *cadBA*-Operons wird der σ^{70} -Faktor benötigt.

Liegen induzierende Bedingungen vor, so wird das konstitutiv vorhandene CadC aktiviert und bindet mit der N-terminalen Domäne an die *cadBA*-Promotor-Region, wobei Bereiche zwischen bp -150 und bp -48 stromaufwärts des *cadBA*-Transkriptionsstart eine Rolle spielen (Meng und Bennett, 1992b; Watson *et al.*, 1992). Kürzlich konnten die beiden CadC-Bindestellen CAD1 und CAD2 identifiziert werden (Küper und Jung, 2005). Durch diese Bindung kommt es zur Transkription von *cadA* und *cadB*.

Das in die Zelle transportierte Lysin wird dann durch die Lysin-Decarboxylase CadA unter Verbrauch eines Protons zu Cadaverin decarboxyliert. CadA hat eine relative Molekülmasse von 82 kDa und ist in seiner aktiven Form vermutlich ein Dekamer. Das pH-Optimum liegt bei pH 5,7 (Sabo *et al.*, 1974).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die AAA⁺-ATPase RavA (*ATPases associated with various cellular activities*) einen Komplex mit CadA ausbildet. Dabei bilden 2 CadA-Dekamere mit maximal 5 RavA-Hexameren einen großen, Käfig-ähnlichen Komplex. Verschiedene *in vivo* und *in vitro* Experimente konnten jedoch keine Beeinflussung der CadA-Aktivität durch diese Komplexbildung zeigen, lediglich die ATPase-Aktivität von RavA wurde stimuliert (Snider *et al.*, 2006). *ravA* liegt zusammen in einem Operon mit *viaA*, das für ein Protein mit einer sog. „Von Willebrand Faktor Typ A“-Domäne kodiert. Die VWA-Domäne ist eine Metall-bindende Domäne, die häufig Protein/Protein-Interaktionen vermittelt (Whittaker und Hynes, 2002).

CadB ist ein membrangebundener Cadaverin/Lysin-Antiporter, der das durch die Decarboxylierung entstehende Cadaverin in das Periplasma schleust. Im Gegenzug wird

Lysin ins Cytoplasma transportiert (Auger *et al.*, 1989). CadB ist vermutlich mit 12 Transmembrandomänen in der Cytoplasmamembran verankert und hat Ähnlichkeit mit dem Ornithin/Putrescin-Antiporter PotE (Meng und Bennett, 1992a; Soksawatmaekhin *et al.*, 2004). Das Protein hat eine relative Molekülmasse von etwa 47 kDa.

Negative Regulation der *cadBA*-Expression

Die *cadBA*-Expression wird unter nicht-induzierenden Bedingungen durch die Lysin-spezifische Permease LysP reprimiert (Neely *et al.*, 1994; Abb. 2). Mutationen in *lysP* führten zu Stämmen, die eine Resistenz gegenüber dem toxischen Lysin-Analogen Thiosin (S-Aminoethylcystein), einen erniedrigten Lysin-Transport und eine erhöhte Lysin-Decarboxylase-Aktivität aufwiesen (Popkin und Maas, 1980; Tabor *et al.*, 1980). Aufgrund der regulatorischen Funktion des *lysP*-Locus wurde dieser auch als *cadR* bezeichnet (Tabor *et al.*, 1980). *lysP* kodiert für die Lysin-Permease LysP (Steffes *et al.*, 1992), einem 53,5 kDa großen Transportprotein, das mit 12 Transmembrandomänen in der Cytoplasmamembran verankert ist (Ellis *et al.*, 1995). Eine Überproduktion von Plasmid-kodiertem LysP führte zu einer Repression der *cadB*-Expression auch unter induzierenden Bedingungen, während Mutationen in *lysP* in einer Lysin-unabhängigen *cadBA*-Expression resultierten (Neely *et al.*, 1994). Die genaue Funktion von LysP bei der Regulation des Cad-Systems ist noch nicht geklärt, aber Neely *et al.* schlugen 1994 zwei Möglichkeiten vor: zum einen könnte Lysin (extra- oder intrazellulär) die Aktivität von CadC regulieren, die Aufgabe von LysP wäre dann die Regulation der Lysin-Konzentration. CadC würde also mit Lysin interagieren, LysP würde um das vorhandene Lysin konkurrieren. Zum anderen wäre denkbar, dass LysP selbst die Aktivität von CadC reguliert. Dies könnte über eine direkte Interaktion beider Proteine geschehen, die durch das Vorhandensein von Lysin, das an LysP und/oder CadC bindet, aufgelöst wird. Bisher konnte aber weder eine Interaktion von CadC und LysP nachgewiesen, noch die Affinitäten von LysP und CadC für Lysin bestimmt werden.

Auch der globale Transkriptionsregulator H-NS ist ein negativer Regulator der *cadBA*-Expression unter nicht-induzierenden Bedingungen (Shi *et al.*, 1993; Abb. 2). H-NS (Histon-ähnliches Nukleoid-Strukturierendes Protein) ist in Enterobakterien ein globaler Repressor; das Protein reprimiert in *E. coli* neben dem Cad-System u. a. auch die induzierbaren Aminosäure-Decarboxylase-Systeme Gad (Giangrossi *et al.*, 2005) und Adi (Shi *et al.*, 1993) unter nicht-induzierenden Bedingungen. *hns*-Deletionsstämme wiesen eine deutlich erhöhte *cadBA*-Expression bei neutralen pH-Werten auf (Shi *et al.*, 1993). H-NS hat eine relative Molekülmasse von 15,4 kDa und liegt in etwa 15000-20000 Kopien pro Zelle vor (Dorman,

2004). H-NS bindet nicht an eine bestimmte Konsensussequenz auf der DNA, sondern bevorzugt an AT-reiche, intrinsisch gekrümmte DNA-Bereiche (Owen-Hughes *et al.*, 1992). Die Interaktion mit der DNA erfolgt mit der C-terminalen Domäne, während die N-terminale Domäne des Proteins für die Ausbildung von Homooligomeren wichtig ist. Diese Fähigkeit zur Oligomerisierung ist essentiell für die Funktion von H-NS (Dorman, 2004). Für H-NS wurde die Ausbildung eines Repressor-Komplexes postuliert, welcher die CadC-Bindestellen unter nicht-induzierenden Bedingungen verdeckt. Durch die Bindung von CadC wird dieser Komplex verdrängt und die Expression von *cadBA* ermöglicht (Küper und Jung, 2005). Die Repression durch H-NS ist möglicherweise für die Sauerstoff-Abhängigkeit der *cadBA*-Expression verantwortlich (Küper, 2005).

Einen negativen Rückkopplungseffekt auf die *cadBA*-Expression haben die beiden Endprodukte der Decarboxylierungsreaktion, nämlich CO_2 (Takayama *et al.*, 1994) und Cadaverin (Neely *et al.*, 1994). Die Mechanismen der Reprimierung konnten jedoch noch nicht geklärt werden.

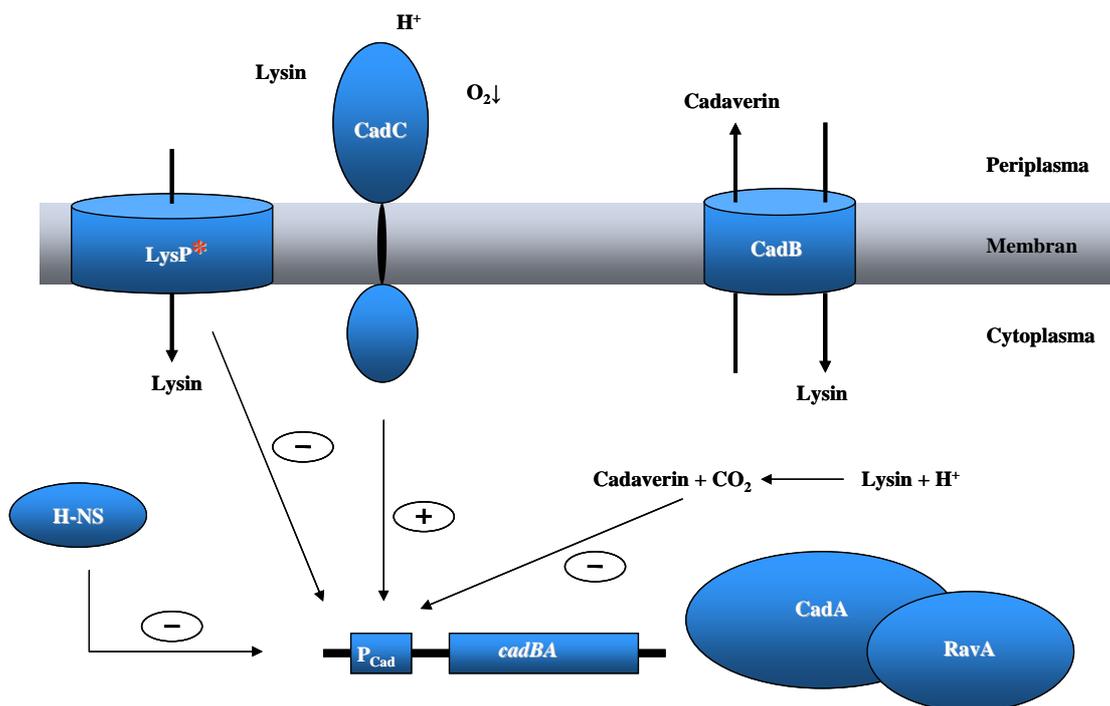


Abb. 2: Schematische Darstellung des Cad-Systems in *E. coli*

Unter induzierenden Bedingungen (niedriger externer pH-Wert, Vorhandensein von Lysin) aktiviert der membrangebundene Transkriptionsregulator CadC die Transkription des *cadBA*-Operons. Die Lysin-Decarboxylase CadA decarboxyliert Lysin unter Verbrauch eines Protons zu Cadaverin und CO_2 . Cadaverin wird durch den Lysin/Cadaverin-Antiporter CadB nach außen transportiert, gleichzeitig wird Lysin importiert. Die bei der Decarboxylierung entstehenden Produkte Cadaverin und CO_2 hemmen die Expression von *cadBA*. LysP und H-NS sind negative Regulatoren der *cadBA*-Expression. Unter anaeroben Bedingungen ist die Expression des *cadBA*-Operons ca. 10mal stärker als unter aeroben Bedingungen.

* LysP ist vermutlich ein Lysin/ H^+ -Symporter (Keseler *et al.*, 2005).

Physiologische Rolle des Cad-Systems in Enterobakterien

Die genaue physiologische Rolle des Cad-Systems ist noch nicht vollständig geklärt. Wie bereits dargestellt kann eine grundsätzliche Funktion beim Säurestress angenommen werden, da zum einen während der Decarboxylierung von Lysin cytoplasmatische Protonen verbraucht werden, zum anderen das ausgeschleuste Cadaverin basischer ist als Lysin, so dass auch im extrazellulären Bereich der Zelle der pH-Wert erhöht wird (Watson *et al.*, 1992; Neely *et al.*, 1994; Dell *et al.*, 1994; Neely and Olson, 1996). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp *E. coli*-Stamm MG1655 bei Wachstum in Gegenwart eines niedrigen pH-Wertes eine deutlich höhere Überlebensrate im Vergleich zu dem Cad-negativen *E. coli* MG1655 Δ *cadC* aufwies. Die Supplementation von *E. coli* MG1655 Δ *cadC* mit externem Cadaverin konnte dessen Überlebensrate jedoch deutlich verbessern, was auf eine Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes durch Cadaverin zurückzuführen war (Küper, 2005). Es konnte auch gezeigt werden, dass *E. coli* unter Phosphat-limitierenden Bedingungen (wie sie auch im menschlichen Darm herrschen) durch die Aktivität von CadA eine höhere Toleranz gegenüber organischen Säuren aufwies (Moreau, 2007). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Funktion des Cad-Systems bei der pH-Homöostase.

Von Bedeutung könnte aber auch die Bereitstellung von CO₂ unter anaeroben Bedingungen sein (Boeker und Snell, 1972), da der Citrat-Zyklus nicht voll aktiv ist und somit ein Mangel an CO₂ herrscht. Indizien hierfür sind die verstärkte *cadBA*-Expression unter anaeroben Bedingungen (Gale, 1942; Sabo *et al.*, 1974; Neely und Olson, 1996) und die Reduktion der *cadBA*-Expression durch die Zugabe von Na₂CO₃ bzw. durch Transformation der Zellen mit einer Plasmid-kodierten CO₂-produzierenden Ornithin-Decarboxylase (Takayama *et al.*, 1994). Futatsugi *et al.* (1997) beschrieben, dass *E. coli* bei anaerobem Wachstum und in Gegenwart eines niedrigen pH-Wertes durch die Zugabe von Lysin zum Medium zwar höhere Zelldichten erreichte, der pH-Wert des Medium jedoch nicht erhöht wurde. Diese Ergebnisse sprechen für eine wichtige Bedeutung der Bereitstellung von CO₂ durch das Cad-System.

Eine weitere Funktion des Cad-Systems ist die Verringerung der Permeabilität der äußeren Membran (Samartzidou und Delcour, 1999; Samartzidou *et al.*, 2003). Dies geschieht zum einen durch die Blockade der beiden Porine OmpC und OmpF durch Cadaverin, zum anderen bindet CadC möglicherweise an die Promotorregionen von *ompC* und *ompF*, dies ergibt sich aus Sequenzvergleichen zwischen der *cadBA*-Promotorregion und Bereichen innerhalb der regulatorischen Regionen von *ompC* und *ompF*. Die Bindung von CadC innerhalb dieser regulatorischen Regionen würde dann eine verringerte Expression von *ompC* und *ompF* bewirken. Eine Verringerung der Permeabilität der äußeren Membran könnte ein

Schutzmechanismus gegenüber toxischen Verbindungen, wie zum Beispiel Gallensalzen im Magen-Darm-Trakt, darstellen.

Soksawatmaekhin *et al.* (2004) sehen die Bedeutung des Cad-Systems v. a. in der Erzeugung eines Membranpotentials in Gegenwart eines niedrigen pH-Wertes, da durch die Antiport-Aktivität von CadB einfach positiv geladenes Lysin importiert und zweifach positiv geladenes Cadaverin exportiert wird. Des Weiteren stellen sie die Erzeugung eines pH-Gradienten durch das Verbrauchen von Protonen bei der Decarboxylierungsreaktion in den Vordergrund. Dadurch wird der intrazelluläre pH-Wert erhöht, die ATP-Konzentration in den Zellen steigt und das Wachstum der Zellen wird allgemein begünstigt.

Auch bei der Pathogenität von Mikroorganismen spielt das Cad-System eine wichtige Rolle. In uropathogenen *E. coli*-Spezies schützen Polyamine, insbesondere Cadaverin, vor nitrosativem Stress, welcher bei der Immunantwort in Form von Stickstoffoxid und reaktiven Stickstoffintermediaten entsteht (Bower und Mulvey, 2006). In *Vibrio*-Stämmen wurde ein Schutz vor Superoxid-Stress durch Cadaverin gezeigt (Kim *et al.*, 2006).

In manchen Enterobakterien wird das Cad-System jedoch inaktiviert, so z. B. in enteroinvasiven *E. coli*- und *Shigella*-Spezies, u. a. durch die Insertion von IS-Elementen in *cadC* (Casalino *et al.*, 2003). Cadaverin verhindert z. B. die Wanderung von polymorphkernigen Leukozyten durch das intestinale Epithel, welche *Shigella* für das Eindringen in das Gewebe des Wirtes nützt (Sansonetti, 2001). Die Komplementation von verschiedenen Cad-negativen enteropathogenen *E. coli*-Stämmen mit dem intakten *cadBA*-Operon resultierte z. B. in einer verringerten Adhärenz der Bakterien an Zellen in Gewebekulturen (Jores *et al.*, 2006). Ein funktionelles Cad-System wäre in diesen Fällen ungünstig.

Topologie und Aktivierung von CadC

CadC ist ein membrangebundener Transkriptionsaktivator mit einer relativen Molekülmasse von 58 kDa und gehört zur Familie der ToxR-ähnlichen Transkriptionsaktivatoren (Miller *et al.*, 1987). Es besteht aus 512 Aminosäuren, wobei die Aminosäuren 1-158 die N-terminale, cytoplasmatische Domäne, die Aminosäuren 159 bis 187 die Transmembranhelix und die Aminosäuren 188-512 die C-terminale, periplasmatische Domäne ausbilden (Watson *et al.*, 1992; Dell *et al.*, 1994; Abb. 3). Die N-terminale Domäne zeigt Sequenzähnlichkeit zur RO_{II}-Untergruppe der DNA-Bindedomänen verschiedener Transkriptionsregulatoren, wie z. B. PhoP aus *Bacillus subtilis*, VirG aus *Agrobacterium tumefaciens* oder OmpR aus *E. coli* (Watson *et al.*, 1992). Aminosäuren 2-103 bilden ein so genanntes *winged Helix-Turn-Helix*-Motiv aus, wie es für die Mitglieder der RO_{II}-Untergruppe typisch ist (Martinez-Hackert und

Stock, 1997). Die N-terminale Domäne von CadC bindet in der *cadBA*-Promotor-Region an die DNA (Meng und Bennett, 1992b; Watson *et al.*, 1992; Küper und Jung, 2005) und ermöglicht somit die Expression des *cadBA*-Operons.

Die C-terminale Domäne von CadC befindet sich im Periplasma und wird als Reizwahrnehmungsdomäne beschrieben, da zufällige Aminosäureaustausche bzw. das Anfügen eines Histidin-Tag zu einer veränderten Reizwahrnehmung führten (Dell *et al.*, 1994; Neely und Olson, 1996; Küper, 2001; Kraxenberger, 2006; Abb. 3).

Wie genau die Reize wahrgenommen werden ist unklar, sie werden aber wahrscheinlich unabhängig voneinander registriert. *Primer-Extensions-Analysen* zeigten, dass die Reihenfolge in der die Reize registriert werden für die CadC-Aktivierung vermutlich irrelevant ist (nicht-sequentielles Modell; Neely und Olson, 1996). Unklar ist ebenso, wie die wahrgenommenen Reize in das Zellinnere transloziert werden und wie das membranständige CadC an die DNA binden kann.

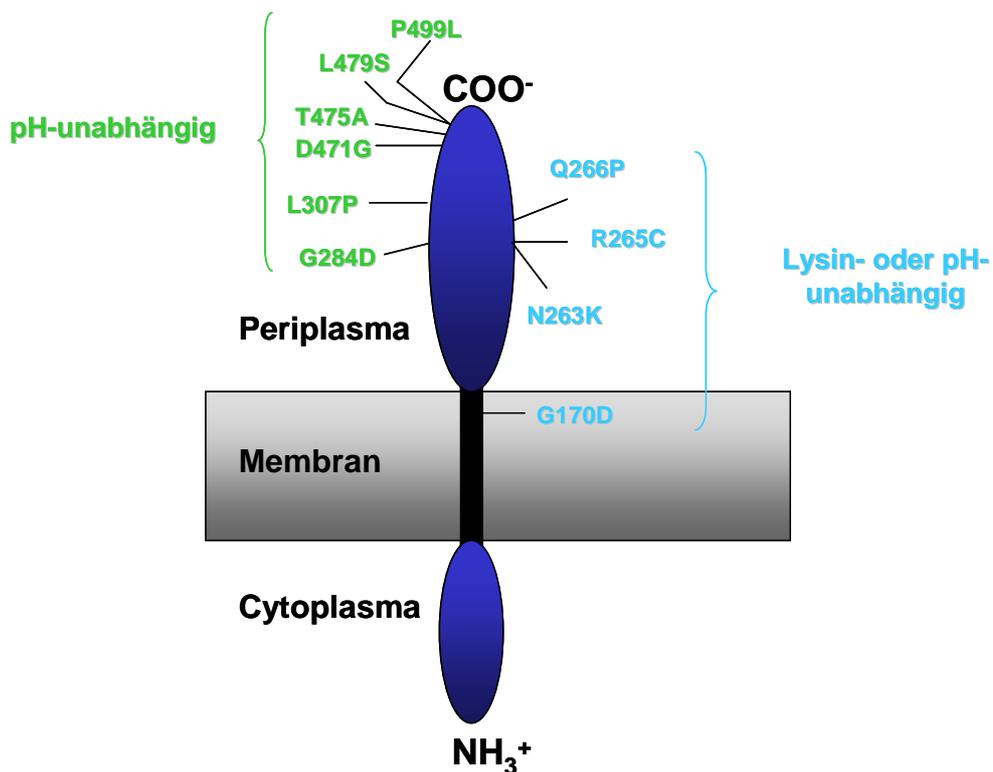


Abb. 3: Modularer Aufbau von CadC

CadC besteht aus 512 Aminosäuren, wobei die Aminosäuren 1-158 die N-terminale, cytoplasmatische Domäne ausbilden, welche für die DNA-Bindung zuständig ist, die Transmembranhelix besteht aus den Aminosäuren 159 bis 187 und die C-terminale, periplasmatische Domäne aus den Aminosäuren 188-512. Die periplasmatische Domäne ist die Reizwahrnehmungsdomäne. Die von Dell *et al.* (1994) bzw. Neely und Olson (1996) identifizierten Aminosäureaustausche, die eine pH-unabhängige bzw. Lysin-unabhängige *cadBA*-Expression induzierten, sind dargestellt. Aminosäureaustausch L307P wurde von Kraxenberger (2006) identifiziert. Die meisten Mutanten induzierten auch eine Cadaverin-unabhängige *cadBA*-Expression.

Für die Aktivierung von CadC wurden 2 Mechanismen postuliert (Küper, 2005):

(1) CadC liegt im aktiven Zustand als Oligomer vor und kann nur dann an die DNA binden. Hinweise hierfür sind das Vorhandensein der beiden CadC-Bindestellen Cad1 und Cad2 und verschiedene *in vitro* und *in vivo* Experimente, die zeigen konnten, dass CadC Oligomere ausbilden kann (Küper, 2005; Kraxenberger, 2006). Voraussetzung hierfür ist eine räumliche Nähe von CadC zu P_{Cad}.

(2) Nach Wahrnehmung und Translokation der Signale über die Membran wird die N-terminale Domäne proteolytisch abgespalten, somit könnte die DNA-bindende Domäne von CadC frei im Cytoplasma zu P_{Cad} diffundieren. Ein Hinweis hierfür ist ein während der Überproduktion und Reinigung von CadC auftauchendes Peptid, das als Abbauprodukt von CadC identifiziert werden konnte. Eine mögliche proteolytische Funktion könnte hierbei die membranständige Protease FtsH ausüben (Kraxenberger, 2006). Dennoch konnte keiner der beiden Mechanismen eindeutig belegt werden, zusätzlich könnte auch das Vorhandensein weiterer Genprodukte für die Aktivierung des Cad-Systems nötig sein (Kraxenberger, 2006).

Die Familie der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren

Aufgrund der Topologie zählt CadC aus *E. coli* zur Familie der ToxR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren. Benannt wurde diese Familie nach ToxR aus *V. cholerae* und anderen *Vibrio*-Spezies, das die Expression von verschiedenen Virulenzfaktoren reguliert (Miller *et al.*, 1987). Zu dieser Familie gehören auch CadC-Proteine aus *Salmonella typhimurium*, *V. cholerae* (Merrell und Camilli, 2000) und *Vibrio vulnificus* (Rhee *et al.*, 2002; Rhee *et al.*, 2005), welche ebenfalls die *cadBA*-Expression regulieren. Zu dieser Familie zählen auch TcpP aus *V. cholerae*, das ein Co-Regulator der Virulenzgenexpression ist (Hase und Mekalanos, 1998), PsaE aus *Yersinia pseudotuberculosis* (wichtig für die Expression der Fimbriengene; Yang und Isberg, 1997) und WmpR aus *Pseudoalteromonas tunicata* (spielt eine Rolle bei der Bildung von Typ IV-Pili und Regulation der Biofilmbildung; Egan *et al.*, 2002). Die Mitglieder dieser Familie haben den modularen Aufbau aus einer DNA-bindenden N-terminalen Domäne mit dem *winged Helix-Turn-Helix*-Motiv, einer einzelnen Transmembrandomäne und einer C-terminalen, periplasmatischen Reizwahrnehmungsdomäne gemeinsam. Aufgrund von Ähnlichkeiten auf Ebene der Aminosäuresequenz wird auch HilA aus *S. typhimurium* zu dieser Familie gezählt, jedoch handelt es sich hierbei um ein lösliches Protein. HilA reguliert die Expression von Genen, die bei der Invasion der Bakterien in die Wirtszellen eine Rolle spielen (Bajaj *et al.*, 1995).

Bei den Mitgliedern der ToxR-Familie sind die Wahrnehmung der Reize, die Weiterleitung der Signale und die Regulation der Genexpression innerhalb eines einzigen Proteins vereint, außerdem erfolgt die Signalweiterleitung ohne chemische Modifikation des Proteins, wie z. B. Phosphorylierung. Somit gehören diese Proteine zu den einfachsten Signaltransduktionssystemen in Bakterien.

Das am besten charakterisierte Protein aus dieser Familie ist ToxR, das zentrale Regulatorprotein der Virulenz von *V. cholerae*. ToxR aktiviert die Expression von *ctxAB*, das für die Untereinheiten A und B des Cholera-Toxins kodiert. Die Expression dieses Operons erfolgt in Abhängigkeit vom pH-Wert, der Temperatur, der Osmolarität und der Aminosäurezusammensetzung des Mediums (Miller *et al.*, 1987). Zusätzlich wird die Expression von zahlreichen weiteren Genen durch ToxR reguliert, hierzu zählen z. B. *ompT* und *ompU*, welche für Proteine der äußeren Membran kodieren (Miller und Mekalanos, 1988), oder *tcpA* (kodiert für die Hauptuntereinheit der Pili; Taylor *et al.*, 1987; DiRita *et al.*, 1991). Neben diesen Effektorgenen wird auch die Expression weiterer Aktivatorgene durch ToxR angeschaltet. So aktiviert ToxR zusammen mit dem ToxR-ähnlichen Transkriptionsaktivator TcpP die Transkription von *toxT*, dies erfolgt vermutlich über eine direkte Interaktion zwischen ToxR und TcpP (Krukoni und DiRita, 2003). *toxT* kodiert für den AraC-ähnlichen Transkriptionsregulator ToxT und induziert die Expression zahlreicher Virulenzgene (Higgins *et al.*, 1992; Higgins und DiRita, 1996).

Sowohl TcpP als auch ToxR sind assoziiert mit Co-Aktivatorproteinen. So stabilisiert TcpH die periplasmatische Domäne von TcpP, indem es proteolytischen Abbau durch die Metalloprotease YaeL verhindert (Matson und DiRita, 2005). ToxS wiederum verstärkt die ToxR-vermittelte Aktivierung von *ctxAB* und *toxT* (Miller *et al.*, 1989). Wahrscheinlich interagieren ToxR und ToxS über die periplasmatische Domäne, wobei die Rolle dieser Interaktion vermutlich in einer korrekten Faltung bzw. Stabilisierung der periplasmatischen Domäne von ToxR oder einer Stimulierung der Dimer-Bildung besteht (DiRita und Mekalanos, 1991; Dziejman und Mekalanos, 1994; Pfau und Taylor, 1998).

Aufgabenstellung

Die Proteine der ToxR-Familie gehören zwar zu den einfachsten Signaltransduktionssystemen in Bakterien, dennoch sind die von ihnen kontrollierten Gene häufig Bestandteile von sehr komplexen Regulationsmechanismen, wie das Beispiel der Virulenz in *V. cholerae* zeigt. Auch das zur Säureschutzantwort in *E. coli* gehörende Cad-System ist bisher wenig verstanden, so sind z. B. die Mechanismen der Reizwahrnehmung und der Aktivierung von CadC größtenteils unbekannt.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Regulation der *cadBA*-Expression in *E. coli*, wobei v. a. der Transkriptionsaktivator CadC hinsichtlich der Lysin-Wahrnehmung und der Interaktion mit dem negativen Regulator LysP detailliert untersucht werden soll.

Für ein besseres Verständnis der Funktion des Cad-Systems bei Säurestress soll zunächst *in vivo* ein allgemeiner Überblick anhand von Transkriptions- und Translationsanalysen erhalten werden, wobei die Funktion von LysP bei der Lysin-Abhängigkeit der *cadBA*-Expression und die Rolle von RavA genauer untersucht werden soll. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulrich Gerland und Georg Fritz (Institut für Theoretische Physik der Universität zu Köln) sollen die hier erhaltenen Daten in ein mathematisches Modell integriert werden, um das Cad-System quantitativ zu beschreiben.

LysP ist der negative Regulator der *cadBA*-Expression unter nicht-induzierenden Bedingungen. Die Aufhebung des inhibitorischen Effekts von LysP bei induzierenden Bedingungen ist ein wichtiger Schritt für die Aktivierung von CadC. Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist die Frage, wie CadC und LysP interagieren und wie diese Interaktion aufgelöst wird, v. a. unter Berücksichtigung der Rolle von Lysin.

Die periplasmatische Domäne von CadC ist die Reizwahrnehmungsdomäne. Frühere Arbeiten schlugen eine direkte Wahrnehmung der Signale Lysin bzw. Cadaverin vor. Mit Hilfe von Affinitätsmessungen soll analysiert werden, ob diese Signale tatsächlich direkt von CadC wahrgenommen werden.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Arne Skerra und Dr. Andreas Eichinger (Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München) soll die Struktur von CadC bzw. der periplasmatischen Domäne von CadC (CadC188-512) als Beispiel der ToxR-ähnlichen Transkriptionsaktivatoren mittels 3D-Kristallisation ermittelt werden. Hierfür sollen CadC und CadC188-512 gereinigt und verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 2.1: verwendete Materialien

Agar Agar	Biotechnologie Euler (Frankfurt a. M.)
Agarose	Serva (Heidelberg)
L-Alanin	E. Merck (Darmstadt)
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs (NEB; Frankfurt)
Alkalische Phosphatase konjugiertes Penta-His-Anti-Mouse-IgG	GE Healthcare (Braunschweig)
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth (Karlsruhe)
Antarktische Phosphatase	NEB (Frankfurt)
[γ ³² -P]ATP	GE Healthcare (Braunschweig)
[α ³² -P]dCTP	GE Healthcare (Braunschweig)
L(+)-Arabinose	Roth (Karlsruhe)
BioBeads	BioRad (München)
Cadaverin Dihydrochlorid	Sigma (Deisenhofen)
Carbenicillin (Dinatriumsalz)	Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol	Sigma (Deisenhofen)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth (Karlsruhe)
Desoxyribonuklease I (DNase)	Sigma (Deisenhofen)
DNA-Standard (1 kb DNA-Leiter, 2-Log DNA-Leiter)	NEB (Frankfurt)
DNeasy Tissue Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
dNTPs (Desoxy-Nukleotidtriphosphate)	Invitrogen (Karlsruhe)
Disuccinimidylsuberat (DSS)	Pierce (Rockford)
HMW-Proteinstandard	Sigma (Deisenhofen)
Isopropyl-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	PeqLab (Erlangen)
Kanamycin(sulfat)	Roth (Karlsruhe)
Lauryldimethylaminoxid (LDAO), <i>BioChemika</i> , $\geq 99.0\%$ (NT)	Fluka (Neu-Ulm)
LDAO, purum, ~30% in H ₂ O	Fluka (Neu-Ulm)
Lipide (<i>E. coli</i>)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
L-Lysin freie Base	Sigma (Deisenhofen)
L-Lysin Monohydrochlorid	Roth (Karlsruhe)
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid	Calbiochem (La Jolla, Kalifornien)
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen GmbH (Hilden)

Nitrozellulose-Membran	Schleicher&Schuell (Dassel)
Nucleotide Removal Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
Nylon-Membran	GE Healthcare (Braunschweig)
Oligonukleotide	Invitrogen (Karlsruhe) bzw. Operon (Köln)
o-(2-Maleimidoethyl)-o'-methyl-polyethylenglycol 5'000 (PEG-Maleimid)	Fluka (Neu-Ulm)
ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (oNPG)	Sigma (Deisenhofen)
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas (St. Leon-Rot)
Penta-His-Anti-Mouse-IgG	GE Healthcare (Braunschweig)
Phenol-Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Deisenhofen)
“Prestained”-HMW-Proteinstandard	Sigma (Deisenhofen)
Proteinstandard Precision Plus	BioRad (München)
Protogel-Fertiglösung	Biozym Diagnostics (Hess. Oldendorf)
Pyridoxalphosphat (PLP)	Fluka (Neu-Ulm)
QIAprep-spin Plasmid Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
QIAquick-Gel-Extraction Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
QIAquick-PCR-Purification Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
Restriktionsenzyme	NEB (Frankfurt)
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem (Darmstadt)
RNA-Leiter	NEB (Frankfurt)
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen (Karlsruhe)
Spermidin	Fluka (Neu-Ulm)
T4-DNA-Ligase	NEB (Frankfurt)
Taq-DNA-Polymerase	Gibco/BRL (Eggenstein)
Thiosin (S-Aminoethylcystein)	Sigma (Deisenhofen)
Tri-Nitro-Benzolsulfonsäure (TNBS)	Sigma (Deisenhofen)
Tris(2-carboxyethyl)phosphin-hydrochlorid (TCEP)	Sigma (Deisenhofen)

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen Bayer (Leverkusen), Biomol (Hamburg), BioRad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), ICN Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio), E. Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad “pro analysis“ bezogen.

2.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tab. 2.1, die verwendeten Plasmide in Tab. 2.2 und die verwendeten Oligonukleotide in Tab. 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 hsdR17 supE44relA1</i> $\Delta(lac-proAB)/F'$ [<i>traD36proAB*lacI^qlacZ</i> Δ M15]	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1985)
BL21(DE3)pLysS	<i>F ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻)gal dcm</i> (DE3)pLysS (Cm ^R)	Studier und Moffat (1986)
EP314	<i>F IN(rrnD-rrnE) $\Delta(lacIOPZYA)$ exa-1::MuDI1734 (Km lac) cadC1::Tn10</i>	Neely <i>et al.</i> (1994)
Origami™ B(DE3) pLysS	<i>F ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 gor522::Tn10 (Tc^R) trxB::kan</i> (DE3)pLysS (Cm ^R)	Novagen
MG1655	K12-Referenzstamm	Blattner <i>et al.</i> (1997)
MG1655 Δ <i>cadC</i>	MG1655 <i>cadC::Kan</i> [MG1655 X P1(W3110- <i>cadC</i>)]	Küper, 2005
MG1655 Δ <i>ravA</i>	Δ <i>ravA</i> / Δ <i>viaA</i> in MG1655; Einfügen einer Cm-Resistenzkassette über Lambda Red System; Kassette entfernt über FLP-Recombinase	Snider <i>et al.</i> (2006)
MG1655- <i>lysP211</i>	MG1655 mit Basenaustausch an Position 211 im <i>lysP</i> Gen (<i>lysP211</i>); Thiosin ^R	diese Arbeit
MG1655- <i>lysP-G153S</i>	MG1655 mit Basenaustausch an Position 457 im <i>lysP</i> Gen; Aminosäureaustausch G \rightarrow S an Position 153; Thiosin ^R	diese Arbeit
MG1655 Δ <i>cadC/lysP242</i>	MG1655 Δ <i>cadC</i> mit Basenaustausch an Position 242 im <i>lysP</i> Gen (<i>lysP242</i>); Thiosin ^R	diese Arbeit

Bei allen aufgeführten Stämmen handelt es sich um Derivate von *E. coli*.

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Genotyp	Herkunft
pUC19	Amp ^R	Klonierungsvektor	(Yanish-Perron <i>et al.</i> (1985)
pUC19- <i>cadC</i>	Amp ^R	<i>his₁₀-cadC</i> in pUC19	Küper (2005)
pUC19- <i>cadC1-215</i>	Amp ^R	<i>his₁₀-cadC1-215</i> in pUC19	Küper (2005)
pUC19- <i>cadC188</i>	Amp ^R	<i>his₆-cadC188-512</i>	Unfried (2003); persönliche Gabe
pUC19- <i>cadC188-R265C</i>	Amp ^R	<i>his₆-cadC188-512-R265C</i>	Unfried (2003); persönliche Gabe

Plasmid	Resistenz	Genotyp	Herkunft
pUC19- <i>lysP</i>	Amp ^R	<i>lysP-his₆</i> in pUC19	diese Arbeit
pUC19- <i>lysP211</i>	Amp ^R	<i>lysP211-his₆</i> in pUC19	diese Arbeit
pET16b	Amp ^R	Klonierungs- und Expressionsvektor	Novagen
pET16b- <i>cadC</i>	Amp ^R	<i>his₁₀-cadC</i> in pET16b	Küper (2001)
pET16b- <i>cadC</i> -C208A	Amp ^R	<i>his₁₀-cadC</i> -C208A in pET16b	Dönhöfer (2007)
pET16b- <i>cadC</i> -C272A	Amp ^R	<i>his₁₀-cadC</i> -C272A in pET16b	Dönhöfer (2007)
pET16b- <i>cadC</i> -C208A/ C272A	Amp ^R	<i>his₁₀-cadC</i> -C208A/C272A in pET16b	Dönhöfer (2007)
pET16b- <i>ravA</i>	Amp ^R	<i>his₁₀-ravA</i> in pET16b	diese Arbeit
pET16b- <i>viaA</i>	Amp ^R	<i>his₁₀-viaA</i> in pET16b	diese Arbeit
pT7-5	Amp ^R	Expressionsvektor	Tabor und Richardson (1985)
pT- <i>caiT</i>	Amp ^R	<i>caiT</i> in pT7-5	Jung <i>et al.</i> (2002)
pT- <i>lysP</i>	Amp ^R	<i>lysP-his₆</i> in pT7-5	diese Arbeit
pT- <i>lysP211</i>	Amp ^R	<i>lysP211-his₆</i> in pT7-5 ⁽¹⁾	diese Arbeit
pT- <i>lysP242</i>	Amp ^R	<i>lysP242-his₆</i> in pT7-5 ⁽²⁾	diese Arbeit
pT- <i>lysP</i> -G153S	Amp ^R	<i>lysP</i> -G153S- <i>his₆</i> in pT7-5	diese Arbeit
pBAD24	Amp ^R	Expressionsvektor	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pBAD24- <i>cadC</i>	Amp ^R	<i>his₁₀-cadC</i> in pBAD24	Küper (2005)
pBAD24- <i>cadC</i> 1-215	Amp ^R	<i>his₁₀-cadC</i> 1-215 in pBAD24	Küper (2005)
pBAD24- <i>lysP</i>	Amp ^R	<i>lysP-his₆</i> in pBAD24	diese Arbeit
pBAD33	Cm ^R	Expressionsvektor	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pBAD33- <i>lysP</i>	Cm ^R	<i>lysP-his₆</i> in pBAD33 ⁽³⁾	diese Arbeit
pET32a	Amp ^R	Expressionsvektor	Novagen
pET32a- <i>trx-cadC</i> 188-512	Amp ^R	<i>his₆-cadC</i> 188-512 in pET32a	diese Arbeit
pET32a- <i>trx-cadC</i> 188-512- R265C	Amp ^R	<i>his₆-cadC</i> 188-512-R265C in pET32a	diese Arbeit

⁽¹⁾ durch Punktmutation an Position 211 in *lysP* entsteht vorzeitiges Stopp-Codon in LysP

⁽²⁾ durch Punktmutation an Position 242 in *lysP* entsteht vorzeitiges Stopp-Codon in LysP

⁽³⁾ Vektor pBAD33-*lysP* enthält Shine-Dalgarno-Sequenz aus pBAD24

Nährböden wurden durch Zugabe von 1,5% (w/v) Agar hergestellt. Antibiotika wurden in Konzentrationen von 100 µg/mL (Ampicillin, Carbenicillin), 50 µg/mL (Kanamycin) bzw. 34 µg/mL (Chloramphenicol) zugesetzt. Die Optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem „Spekol 1100“ Photometer (Analytic Jena, Jena), einem „Eppendorf Biophotometer“ (Eppendorf, Hamburg) oder einem „Ultrospec 2100 pro“ der Firma Amersham Biosciences bestimmt.

2.3.1 Induktion und Aktivität des Cad-Systems

Die Kultivierung von Zellen für die Charakterisierung der CadA- bzw. β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte folgendermaßen: wurden die Zellen aerob inkubiert, wurden entweder Erlenmeyerkolben mit Schikane verwendet, die maximal mit ¼ des Gesamtvolumens befüllt wurden und bei 200 rpm geschüttelt wurden, 50 mL Falcon-Röhrchen mit 5-10 mL Kultur, die ebenfalls geschüttelt wurden, oder aber Reagenzgläser, die 5 mL Medium enthielten und auf einem Roller inkubiert wurden. Erfolgte eine mikroaerobe Kultivierung, so wurden entweder Erlenmeyerkolben ohne Schikane, 10 mL-Greiner-Röhrchen oder Reagenzgläser verwendet. Die Erlenmeyerkolben und Greiner-Röhrchen waren maximal mit Medium gefüllt und wurden vorsichtig geschwenkt, um ein Sedimentieren der Zellen zu vermeiden. Die Reagenzgläser enthielten 5-10 mL Medium und wurden über Nacht ohne Schwenken stehen gelassen. Die Übernachtskulturen wurden in der Regel aerob in LB-Medium kultiviert (bei Versuchen in Komplexmedium), oder aerob in KE-Medium, pH 7,6 (bei Versuchen in Minimalmedium). Die Übernachtskulturen wurden so in das jeweilige Versuchsmedium überimpft, dass die Optische Dichte bei 600 nm zu Beginn des Versuchs bei ~ 0,05 lag. Die Kultivierung wurde immer bei 37°C durchgeführt.

2.3.2 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems

Für die zeitabhängige Analyse des Cad-Systems wurden die *E. coli*-Stämme MG1655, MG1655-*lysP211* bzw. MG1655Δ*ravA* wie folgt kultiviert: 5 L KE-Medium (pH 7,6) wurden mit einer Übernachtskultur des jeweiligen Stammes inokuliert und bei 37°C bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase aerob kultiviert (in 2 L-Schikanekolben). Für die Analyse des Cad-Systems wurden hier erste Proben entnommen (= Zeitpunkt t_{30}). Anschließend wurden die Zellen bei 7878 x g bei 37°C abzentrifugiert, in einem geringen Volumen an KE-Medium (pH 7,6) resuspendiert und sofort in einen 5 L-Fermenter Biostat®B (B. Braun, Biotech International) überführt, der KE-Medium (pH 5,8) +/- 10 mM Lysin enthielt (= Zeitpunkt t_0). Nun wurden die Zellen für weitere 4 h bei 37°C kultiviert, wobei mikroaerobe

Bedingungen erreicht wurden indem keine Begasung des Fermenters erfolgte. Um ein Sedimentieren der Zellen zu verhindern, wurden diese bei ca. 50 rpm gerührt. Regelmäßig wurden Proben entnommen und anhand dieser die *cadBA*-Transkription (2.4.13), die spezifische Lysin-Decarboxylase-Aktivität in Zellextrakten (2.5.13) und die Konzentration von Cadaverin im Medium (2.5.14) analysiert. Die Bestimmung des pH-Wertes wurde mit einer sich im Fermenter befindenden pH-Sonde durchgeführt. Die Gesamtzellzahl wurde anhand der Optischen Dichte bei 600 nm in einem „Eppendorf Biophotometer“ (Eppendorf, Hamburg) analysiert. Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurden mit 0,9% (w/v) NaCl (Saline) Verdünnungsreihen hergestellt, auf LB-Agarplatten ausplattiert und die Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten (cfu; *colony forming units*) bestimmt.

Für die *cadBA*-Transkriptionsanalyse bei verschiedenen Wachstumsbedingungen in *E. coli* MG1655 Δ *ravA* wurden die Zellen in Erlenmeyerkolben aerob in KE-Medium (pH 7,6) bei 37°C bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert, anschließend abzentrifugiert und in neues Medium mit den nachfolgend beschriebenen Bedingungen überführt. Diese waren KE-Medium, pH 7,6 (+ 10 mM Lysin bzw. ohne Lysin) und KE-Medium, pH 5,8 (+ 10 mM Lysin bzw. ohne Lysin), wobei jeweils 50 mL-Erlenmeyerkolben (ohne Schikane) maximal mit Medium gefüllt waren. Um mikroaerobe Bedingungen zu erreichen wurden die Kolben nur leicht geschwenkt. 25 min nach dem Überführen der Zellen wurden diese geerntet und die Transkriptionsanalyse wie unter 2.4.13 beschrieben durchgeführt.

2.3.3 Charakterisierung von *E. coli* MG1655-*lysP211*

Für die Charakterisierung der *cadBA*-Expression in *E. coli* MG1655-*lysP211* wurden die Zellen in 50 mL KE-Medium (pH 7,6 bzw. 5,8) mikroaerob bis zu Beginn der stationären Phase kultiviert. Dem Medium wurden 10 mM Lysin oder keine Zusätze beigefügt. Als Maß für die *cadBA*-Expression wurde die spezifische CadA-Aktivität in zellfreien Extrakten (2.5.13) bestimmt.

2.3.4 Einfluss von Lysin auf die *cadBA*-Expression

Um den Einfluss von Lysin auf die *cadBA*-Expression zu untersuchen, wurde *E. coli* MG1655 in 5 mL M63-Minimalmedium (pH 5,8) in Gegenwart von 0 bis 250 mM Lysin in Reagenzgläsern über Nacht bei 37°C inkubiert und dann für die Bestimmung der spezifischen CadA-Aktivität in zellfreien Extrakten (2.5.13) geerntet. Für die Analyse des Lysin-Effekts bei *LysP*-Überproduktion erfolgte die Kultivierung von *E. coli* MG1655 und *E. coli* MG1655-

lysP211 in 50 mL KE-Medium (50 mL Kolben ohne Schikane), pH 5,8, mikroaerob in Gegenwart von 10 bis 100 mM Lysin. Die Überproduktion von LysP wurde durch Zugabe von 0,25 mM IPTG zu *E. coli* MG1655-*lysP211*-pT-*lysP* erzielt.

2.3.5 Charakterisierung von *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S

Für die Untersuchung der Lysin-Abhängigkeit der *cadBA*-Expression wurden die *E. coli*-Stämme MG1655 und MG1655-*lysP*-G153S in 10 mL KE-Medium (pH 5,8) mikroaerob bis zu Beginn der stationären Wachstumsphase inkubiert. Das Medium enthielt 0 bzw. 10 mM Lysin. Für die Analyse des Einflusses von pT-*lysP*-G153S auf die *cadBA*-Expression wurden die *E. coli*-Stämme MG1655-*lysP211*, MG1655-*lysP211*-pT-*lysP* und MG1655-*lysP211*-pT-*lysP*-G153S in 10 mL LB-Medium (pH 5,8) mikroaerob in Gegenwart von 0,25 mM IPTG bis zu Beginn der stationären Wachstumsphase inkubiert. Die Bestimmung der spezifischen CadA-Aktivität in zellfreien Extrakten wurde wie unter 2.5.13 beschrieben durchgeführt.

2.3.6 Analyse des Einflusses von CadC-C208A und CadC-C272A auf die *cadBA*-Expression

E. coli EP314 wurde mit pET16b-*cadC*, pET16b-*cadC*-C208A, pET16b-*cadC*-C272A bzw. pET16b-*cadC*-C208/C272A transformiert und mikroaerob in 10 mL KE-Medium, pH 5,8 (+/- 10 mM Lysin) kultiviert. Um den Einfluss einer LysP-Überproduktion zu analysieren, wurden transformierte Zellen (EP314-pET16b-*cadC*/pBAD33-*lysP* bzw. EP314-*cadC*-C272A/pBAD33-*lysP*) mikroaerob in LB-Medium (pH 5,8) kultiviert und die Genexpression von pBAD33-*lysP* mit 0,2% (w/v) Arabinose während der logarithmischen Wachstumsphase für drei Stunden induziert.

2.3.7 Co-Expression von *cadC/lysP* bzw. *cadC1-215/lysP*

Für die Versuche zur Co-Expression von *cadC/lysP* bzw. *cadC1-215/lysP* wurde *E. coli* MG1655Δ*cadC/lysP242* in verschiedenen Ansätzen mit den Plasmiden pBAD24-*cadC*, pBAD24-*cadC*/pBAD33-*lysP*, pBAD24-*cadC1-215* bzw. pBAD24-*cadC1-215*/pBAD33-*lysP* (co-)transformiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte aerob in 10 mL LB-Medium bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Genexpression mit 0,2 % (w/v) Arabinose für 3 h induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und zellfreie Extrakte gewonnen, um die spezifische CadA-Aktivität (2.5.13) zu bestimmen. Zusätzlich wurde mit Hilfe eines Western Blots (2.5.8) überprüft, ob ungefähr gleiche Mengen CadC und LysP bzw. CadC1-215 und LysP co-produziert wurden, um sicher zu

stellen, dass beobachtete Effekte nicht auf unterschiedliche Proteinmengen zurückzuführen waren.

2.3.8 Hemmung der *cadBA*-Expression durch Cadaverin

Um die Bedeutung der periplasmatischen Domäne von CadC für die Interaktion mit Cadaverin *in vivo* zu analysieren, wurden *E. coli* EP314-pBAD24-*cadC* und *E. coli* EP314-pBAD24-*cadC*1-215 in 10 mL LB-Medium (pH 5,8) mikroaerob bei 37°C bis zu Beginn der stationären Wachstumsphase kultiviert. Das Medium enthielt entweder 1,3 mM Cadaverin oder keine Zusätze. Um ungefähr gleiche Mengen von CadC und CadC1-215 in den Zellen zu erhalten, wurde die Genexpression in *E. coli* EP314-pBAD24-*cadC* mit 0,2% (w/v) Glucose von Anfang an reprimiert, in *E. coli* EP314-pBAD24-*cadC*1-215 jedoch mit 0,05% (w/v) Arabinose von Anfang an induziert.

2.3.9 Kultivierung zur Überproduktion von Proteinen

Für die Überproduktion von CadC wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*cadC* aerob in LB-Medium bei 37°C kultiviert. Die Kultivierung erfolgte entweder in 2 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane oder in einem 30 L-Fermenter (Biostat®C; B. Braun, Biotech International). Die Genexpression wurde entweder von Anfang an durch 0,5 mM IPTG induziert, wobei die Kultur dann bis zum Erreichen einer $OD_{600} \sim 1,8$ kultiviert wurde, oder die Induktion erfolgte erst in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase für 3 h.

Für die Überproduktion von Thioredoxin-CadC188-512 bzw. Thioredoxin-CadC188-512-R265C wurde *E. coli* Origami™ B (DE3)pLysS, transformiert mit pET32a-*trx-cadC*188-512 bzw. pET32a-*trx-cadC*188-512-R265C, in LB-Medium aerob bei 30°C bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und die Genexpression durch 0,1 mM IPTG für 3 h induziert. Die Kultivierung wurde entweder in 2 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane oder in einem 30 L-Fermenter (Biostat®C; B. Braun, Biotech International) durchgeführt.

Um LysP zu produzieren, wurde *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pT-*lysP* aerob in LB-Medium bei 37°C kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in 2 L-Erlenmeyerkolben, die Genexpression wurde in der logarithmischen Wachstumsphase mit 0,5 mM IPTG für 3 h induziert.

Für die Überproduktion von RavA bzw. ViaA wurden *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*ravA* bzw. *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*viaA* aerob bei 30°C (RavA) bzw. bei 18°C (ViaA) in LB-Medium kultiviert und die Genexpression in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase mit 0,4 mM IPTG über Nacht induziert.

Um das Vorhandensein des C-terminalen His₆-Tag bei LysP und den LysP-Derivaten LysP211, LysP242 und LysP-G153S zu überprüfen, wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit den Plasmiden pT-*lysP*, pT-*lysP211*, pT-*lysP242* bzw. pT-*lysP-G153S* transformiert und in LB-Medium aerob bei 37°C kultiviert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0,5 mM IPTG in der logarithmischen Wachstumsphase für 3 h. Die Durchführung des Western Blots erfolgte wie bei 2.5.8 beschrieben.

2.3.10 Dauerkulturen

Die Lagerung von Bakterienstämmen erfolgte in Glycerolkulturen. Hierfür wurden frisch kultivierte, stationäre Kulturen mit 10% (v/v) Glycerol versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Dauerkulturen wurden während der Laborzeit bei -20°C gelagert.

2.4 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.4.1 Plasmidisolierung

Plasmid-DNA wurde aus 5 mL Übernachtskulturen mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 30 µL EB-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) aufgenommen.

2.4.2 Isolierung von chromosomaler DNA

Chromosomale DNA wurde aus 1 mL Übernachtskultur des jeweiligen Stammes mittels des „DNeasy Tissue Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.4.3 Modifikation von DNA

Die Standard-DNA-Techniken wurden, falls nicht anders beschrieben, nach Maniatis *et al.* (1982) durchgeführt. Die *in vitro* Veränderungen von DNA-Molekülen wie Restriktionen und Ligationen wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zur Vermeidung von Religationen für 30 min bei 37°C mit Alkalischer Phosphatase behandelt.

2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) verwendet, die mit 0,2 µg/mL Ethidiumbromid versetzt waren.

Vor dem Lauf wurde 1/10 des Volumens an 10 x DNA-Probenpuffer [50% (w/v) Glycerol; 0,1 M EDTA; 1% (w/v) SDS; 0,25% (w/v) Bromphenolblau] zu den Proben gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen diente entweder eine 1 kb DNA-Leiter oder eine 2-Log DNA-Leiter (0,1-10,0 kb) von NEB. Der Gellauf wurde in einer „Mini Sub DNA Cell“-Agarosegel-Laufkammer (Bio-Rad) bei konstant 100 V für 30-45 min durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 304 nm, die Dokumentation der Gele mit einer Gel-Dokumentationsanlage der Firma PeqLab.

2.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels des „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen isoliert. Die Elution der extrahierten DNA erfolgte mit 30 µL EB-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5).

2.4.6 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde durch den Sequenzierservice des Bereichs Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Diese erfolgte nach dem Prinzip des “Cycle Sequencing”, welches auf dem nach Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden basiert. Die Sequenzierreaktion erfolgte in einem Endvolumen von 20 µL mit 200-500 ng Plasmid-DNA, 3 pmol Oligonukleotid und 4 µL „BigDye® Terminator Ready-Reaction“-Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt) in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg). Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgte dabei pro Reaktionszyklus für 0,5 min bei 96°C, das Anlagern der Oligonukleotide für 0,25 min bei 45°C und die DNA-Amplifikation für 4 min bei 72°C. Nach 30 Zyklen wurde die Reaktion beendet und die Reaktionsansätze bis zur Weiterbearbeitung bei 4°C gekühlt. Die DNA wurde mit Hilfe des “DyeEx Spin“-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Proben wurden anschließend in einem „ABI Prism Model 310“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) einer Elektrophorese unterzogen und ausgewertet. Bei einem neueren Model wurde die Sequenzierreaktion in einem Endvolumen von 10 µL mit ca. 600 ng Plasmid-DNA, 2 pmol Oligonukleotid und 1 µL „BigDye® Terminator v3.1 Sequencing“-Mix in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgte dabei pro Reaktionszyklus für 10 sec bei 96°C, das Anlagern der Oligonukleotide für 15 sec bei 50°C und die DNA-Amplifikation für 4 min bei 60°C (35 Zyklen). Die Proben wurden in einem „ABI Prism Model 3730“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) einer Elektrophorese unterzogen

und ausgewertet. Alternativ wurden DNA-Sequenzanalysen durch die Firma GATC (Konstanz) mit entsprechendem Plasmid und Oligonukleotiden durchgeführt und ausgewertet.

2.4.7 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration von Plasmid-Präparationen bzw. die RNA-Konzentration von Gesamt-RNA wurde photometrisch in einem „Eppendorf BioPhotometer“ (Eppendorf, Hamburg) oder einem „Spekol 1100“ Photometer (Analytic Jena, Jena) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, die Reinheit wurde durch den Quotienten A_{260}/A_{280} ermittelt.

2.4.8 Präparation kompetenter Zellen und Transformation

Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten RbCl-Methode (Promega Technical Manual, 1994). Zur Präparation von kompetenten Zellen wurde eine Übernachtskultur 1:100 in frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,5 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 x g für 5 min abzentrifugiert und im halben Volumen kalter Lösung A (10 mM MOPS, pH 7,0; 10 mM RbCl) resuspendiert. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation bei 4000 x g wurden die Zellen im gleichen Volumen kalter Lösung B (100 mM MOPS, pH 6,5; 50 mM $CaCl_2$; 10 mM RbCl) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in kalter Lösung B (10% des Ausgangsvolumens) aufgenommen und dann direkt für die Transformation verwendet. Für die Transformation wurden 200 μ L kompetente Zellen mit 100-200 ng Plasmid-DNA oder einem kompletten Ligationsansatz 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 sec bei 42°C) wurde zu jedem Ansatz 0,8 mL LB-Medium gegeben und dieser 1 h aerob bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf geeigneten Selektionsnährböden ausplattiert. Bei Plasmidtransformationen wurden 100 μ L des Transformationsansatzes ausplattiert. Wurden Ligationsansätze transformiert, so wurden die Zellen zunächst bei 4000 x g abzentrifugiert, in 100 μ L Medium resuspendiert und alle Zellen ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4.9 Plasmidkonstruktion

Für die Produktion der periplasmatischen Domäne von CadC als Fusionsprotein mit Thioredoxin (Trx-CadC188-512) wurde das Fragment *his₆-cadC188* aus dem Plasmid pUC19-*cadC188* mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NcoI* und *BamHI* ausgeschnitten und über diese Schnittstellen in den Vektor pET32a ligiert. Dadurch entstand das Plasmid pET32a-*trx-cadC188-512*, welches für einen N-terminalen *His₆-Tag* kodiert.

Um den Basenaustausch C (Arginin = CGC) gegen T an Position 793 (Cystein = TGC) in die periplasmatische Domäne von CadC einzuführen, der in dem Aminosäureaustausch R265C resultierte, wurde das Fragment *his₆-cadC188-512-R265C* aus *pUC19-cadC-R265C* mit Hilfe der Oligonukleotide *cadC188-NcoI-his-sense* und *cadC-BamHI-stop-antisense* durch PCR amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BssHIII* in *pUC19-cadC188* ligiert. Dadurch entstand das Plasmid *pUC19-cadC188-512-R265C*. Nach Überprüfung der Sequenz erfolgte die Ligation in *pET32a* über die Schnittstellen *NcoI* und *BamHI*. Dadurch entstand das Konstrukt *pET32-trx-cadC188-512-R265C*. *pUC19-trx-cadC188-512-R265C* und *pET32a-trx-cadC188-512-R265C* kodieren für einen N-terminalen *His₆-Tag*.

Die Fragmente *lysP* und *lysP211* wurden mit den Oligonukleotiden *lysP-sense* und *lysP-antisense* und genomischer DNA von *E. coli* MG1655 bzw. *E. coli* MG1655-*lysP211* als Template durch PCR amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *HindIII* in den Vektor *pUC19* kloniert. Dadurch entstanden die Konstrukte *pUC19-lysP* und *pUC19-lysP211*, welche beide für einen C-terminalen *His₆-Tag* kodieren. Nach Überprüfung der Sequenz erfolgte die Klonierung in den Expressionsvektor *pT7-5* (Tabor und Richardson, 1985). Hierfür wurde aus dem Plasmid *pT-caiT* (Jung *et al.*, 2002) das DNA-Fragment, welches *caiT* enthielt, mit Hilfe von *BamHI* und *HindIII* entfernt und *lysP* bzw. *lysP211* eingefügt. Dadurch entstanden die Plasmide *pT-lysP* und *pT-lysP211*, die ebenfalls für einen C-terminalen *His₆-Tag* kodieren. Die Fragmente *lysP242* und *lysP-G153S* wurden mit den Oligonukleotiden *lysP-sense* und *lysP-antisense* und genomischer DNA von *E. coli* MG1655Δ*cadC/lysP242* bzw. *E. coli* MG1655-*lysP-G153S* als Template durch PCR amplifiziert und mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI* und *HindIII* in *pT-caiT* kloniert, nachdem das Fragment *caiT* entfernt worden war. Die Überprüfung der Sequenz wurde in diesem Vektor durchgeführt.

Der Vektor *pBAD33-lysP* entstand folgendermaßen: *lysP* wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *lysP-NcoI-sense* und *lysP-antisense* und genomischer DNA von *E. coli* MG1655 als Template amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *HindIII* in den Vektor *pBAD24* kloniert. Dadurch entstand das Konstrukt *pBAD24-lysP*. Mit Hilfe von *BamHI* und *HindIII* wurden *lysP* und die Shine-Dalgarno-Sequenz von *pBAD24* in den Vektor *pBAD33* kloniert (enthält keine eigene Shine-Dalgarno-Sequenz). Dadurch entstand das Plasmid *pBAD33-lysP*, welches anschließend sequenziert wurde. Das Konstrukt kodiert für einen C-terminalen *His₆-Tag*.

Um *pET16b-ravA* und *pET16b-viaA* zu konstruieren, wurden *ravA* bzw. *viaA* durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide *ravA_XhoI_sense/ravA_BamHI_antisense* bzw. *viaA_XhoI_sense/*

viaA_BamHI_antisense und genomischer DNA von *E. coli* MG1655 als Template amplifiziert und über die Schnittstellen *XhoI* und *BamHI* in pET16b kloniert. Beide Plasmide kodieren für einen N-terminalen His₁₀-Tag.

2.4.10 Stammkonstruktion

Um *E. coli* MG1655-Derivate, die Mutationen in *lysP* aufwiesen, zu erhalten, wurde eine ungerichtete Mutagenese mit Hilfe von Thiosin durchgeführt. Thiosin (S-Aminoethylcystein) ist ein toxisches Lysin-Analogon, das zu spontanen Mutationen in *lysP* führt (Popkin and Maas, 1980; Tabor *et al.*, 1980). Zellen, die ein intaktes *lysP*-Gen besitzen, können Thiosin, ebenso wie Lysin, in die Zellen transportieren und sind deshalb sensitiv gegenüber diesem Toxin. Zellen mit Mutationen in *lysP* können Thiosin nicht mehr aufnehmen und sind daher resistent. Da kein Lysin im Medium vorhanden sein sollte, wurden *E. coli* MG1655 bzw. MG1655 Δ *cadC* zunächst in Minimalmedium (M63 oder KE-Medium) mit Glucose als C-Quelle kultiviert und mehrmals in Minimalmedium überimpft, um auch geringe Mengen von Lysin auszuschließen. Anschließend wurden die Zellen mehrere Stunden lang in Minimalmedium aerob bei 37°C kultiviert und dann verschiedene Verdünnungsstufen (10⁻⁶ bis 10⁻¹) auf Minimalmedium-Agarplatten, welche 50-500 µg/mL Thiosin enthielten, ausplattiert. Die Inkubation erfolgte 1-2 Tage bei 37°. Thiosin-resistente Mutanten von *E. coli* MG1655, bei denen nach einer Transformation mit pT-*lysP* (kodiert für ein funktionelles LysP) die Thiosin-Resistenz wieder aufgehoben wurde, wurden weiter verwendet, da diese offensichtlich Mutationen in *lysP* aufwiesen. Thiosin-resistente Mutanten von *E. coli* MG1655 bzw. *E. coli* MG1655 Δ *cadC* (nach Transformation mit pET16b-*cadC*) wurden anschließend hinsichtlich einer veränderten *cadBA*-Expression untersucht. So entstanden die Derivate *E. coli* MG1655-*lysP211* (Selektion mit 100 µg/mL Thiosin), *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S (Selektion mit 100 µg/mL Thiosin) und *E. coli* MG1655 Δ *cadC/lysP242* (Selektion mit 250 µg/mL Thiosin). Für den Nachweis des C-terminalen His₆-Tag von LysP und LysP-Derivaten wurde *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit pT-*lysP*, pT-*lysP211*, pT-*lysP242* bzw. pT-*lysP*-G153S transformiert und die Zellen wie unter 2.3.9 beschrieben kultiviert. Der immunologische Nachweis der Proteine wurde wie unter 2.5.8 beschrieben durchgeführt.

2.4.11 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. coli* erfolgte mittels der sauren Phenol-Extraktion nach Aiba *et al.* (1981). Dazu wurden 20 mL Aliquots der Zellen 5 min bei 20199 x g zentrifugiert und das Pellet in 200 µL 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) resuspendiert. Die Zellen

wurden mit 3 mL Lysepuffer [20 mM Natrium-Acetat, pH 5,5; 0,5% (w/v) SDS; 1 mM EDTA, pH 8,0] aufgeschlossen. Die RNA wurde mit 3 mL saurem Phenol extrahiert, wobei eine 5-minütige Inkubation bei 60°C stattfand, die Lösung wurde während dieser Zeit regelmäßig vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurden die Ansätze 10 min bei 11952 x g zentrifugiert. Die RNA wurde erneut bei 60°C mit 3 mL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und anschließend mit 8 mL eiskaltem Ethanol (100%) bei -20°C über Nacht präzipitiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 20199 x g wurde das Pellet mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 35 µL DEPC-H₂O resuspendiert und über Nacht bei -20°C gelöst. Der RNA-Gehalt und die Reinheit wurden photometrisch bestimmt und zusätzlich visuell über ein Agarose-Gel überprüft. Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem [0,1% (v/v)] Wasser angesetzt.

2.4.12 Denaturierende Gelelektrophorese

Jeweils 20 µL Gesamt-RNA (1 µg/µL) wurden mittels denaturierender Gelelektrophorese in einem 1,2% (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Hierzu wurde die Agarose zunächst in 105 mL DEPC-H₂O durch Kochen gelöst und nach dem Abkühlen mit 12 mL 10 x MOPS-Puffer (80 mM Natrium-Acetat; 10 mM EDTA; 200 mM MOPS; pH 7,0) und 3,6 mL Formaldehyd (37%) versetzt. Zu der RNA wurde das gleiche Volumen an „Prämix“ [64,5% (v/v) Formamid; 8,4% (v/v) Formaldehyd; 1,3 x MOPS-Puffer (10,3 mM Natrium-Acetat; 1,3 mM EDTA; 26 mM MOPS; pH 7,0) gegeben, außerdem 0,002 ng/µL Ehtidumbromid und 1/10 des Volumens an 10 x RNA-Farbstoff [50% (w/v) Glycerol; 0,8% (w/v) Bromphenolblau; 0,8% (w/v) Xylencyanol; 1 mM EDTA, pH 8]. Die Ansätze wurden 10 min bei 65°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Der Gellauf wurde bei 60 V (~ 80 mA) für 2-3 Stunden durchgeführt. Als Marker wurde 1,5 µg RNA-Marker (RNA-Leiter, NEB) verwendet. Der Laufpuffer bestand aus 1 x MOPS-Puffer (8 mM Natrium-Acetat; 1 mM EDTA; 20 mM MOPS; pH 7,0). Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem [0,05% (v/v)] Wasser angesetzt.

2.4.13 Northern Blot Analyse

Der Transfer der RNA auf eine Hybond-N Nylon-Membran (GE Healthcare) erfolgte im Prinzip nach dem Protokoll von Jung *et al.* (2001) über Nacht mittels eines Kapillar-Blots. Der Transferpuffer bestand aus 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7). Nach Beendigung des Transfers wurde die auf der Membran befindliche RNA durch 3-minütige

Bestrahlung mit UV-Licht (304 nm) fixiert. Die Prähybridisierung der Membran erfolgte in einem Hybridisierungssofen für mehrere Stunden bei 60°C in 10 mL Hybridisierungslösung [5 x SSC (0,75 M NaCl; 75 mM Natriumcitrat; pH 7); 5 x Denhardt's Reagenz (Denhardt, 1966); 100 µg/mL denaturierte Lachssperma-DNA; 0,1% (w/v) SDS]. Die [α^{32} -P]-dCTP-markierte DNA-Sonde (ca. 10 ng) wurde unmittelbar vor der Verwendung für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Die Hybridisierung erfolgte durch Zugabe der Sonde in 7,5 mL Hybridisierungslösung über Nacht bei 60°C. Anschließend wurde die Membran 3 mal 5 min in jeweils 60 mL Waschlösung [2 x SSC (0,3 M NaCl; 30 mM Natriumcitrat; pH 7); 0,1% (w/v) SDS] bei 42°C gewaschen. Danach wurde die Membran kurz auf Filterpapier getrocknet, die Exposition der Membran erfolgte unter einem „Storage Phosphor Screen“. Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem [0,05% (v/v)] Wasser angesetzt. Die Quantifizierung der Hybridisierungssignale wurde mit Hilfe der Software ImageQuant (Version 5.0; Molecular Dynamics) durchgeführt. Als Kontrolle für die Menge an Gesamt-RNA auf der Membran wurde zusätzlich mit Hilfe einer DNA-Sonde die mRNA von *rpoD* nachgewiesen, deren Menge im Laufe des Versuchs als konstant angenommen wurde. Die erhaltenen Signale für die *cadBA*-mRNA wurden anhand der Signale für die *rpoD*-mRNA korrigiert.

2.4.14 Markierung von DNA

Die Herstellung einer DNA-Sonde zur Detektion von *cadBA*-mRNA und *rpoD*-mRNA erfolgte mittels PCR. Als Template-DNA diente genomische DNA aus *E. coli* MG1655, für die Konstruktion der *cadBA*-spezifischen Sonde wurden die Oligonukleotide *cadB*-*Bam*HI-sense und *cadB*-antisense verwendet, für die Herstellung der *rpoD*-spezifischen Sonde die Oligonukleotide *rpoD*-sense und *rpoD*-antisense. Die Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese verifiziert und isoliert. Je 50 ng der Amplifikate wurden mittels des „*rediprime*TMII DNA Labelling Systems“ (GE Healthcare) mit 5 µL [α^{32} -P]-dCTP (3000 Ci/mmol) nach Vorschrift des Herstellers radioaktiv markiert. Überschüssiges [α^{32} -P]-dCTP wurde mit Hilfe des „Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers entfernt.

Die Markierung des DNA-Fragments „*Cad1-2*“ für die Gelretardationsexperimente erfolgte als 5'-Endmarkierung. 1 µg des Fragments wurde zunächst mit 5 U Antarktischer Phosphatase dephosphoryliert. Die Markierung erfolgte 1 h bei 37°C mit 10 µCi [γ^{32} -P]ATP (3000 Ci/mmol) in T4-Polynukleotidkinase-Puffer (NEB). Überschüssiges [γ^{32} -P]ATP wurde mit Hilfe des „Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers entfernt.

2.5 Biochemische und analytische Methoden

2.5.1 Präparation von Membranvesikeln und Cytosol

Für die Präparation von invertierten Membranvesikeln aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*cadC* wurden Vesikel nach dem Protokoll von Siebers und Altendorf (1988) hergestellt, wobei jedoch ein Aufschlusspuffer verwendet wurde, der Tris/HCl (pH 7,5) und 30 µg/mL DNase enthielt [0,2 g Zellen (Feuchtgewicht)/mL Aufschlusspuffer]. Der Aufschluss erfolgte im Hochdruck-Zellaufschlussgerät (Constant Cell Disruptor Systems, Modell Basic-Z, IUL Instruments GmbH, Königswinter) bei einem Druck von 1,35 kbar (Düse Ø 0,18 mm) und 4°C, Zelltrümmer wurden durch eine niedertourige Zentrifugation abgetrennt. Darauf folgte eine 1-stündige Ultrazentrifugation bei 244.000 x g bei 4°C (Sorvall@Discovery™ 90 SE oder Beckman Coulter Optima™ L-90K). Nach einem Waschschrift der Membranen mit niederionischem Puffer (1 mM Tris/HCl, pH 7,5; 3 mM EDTA, pH 8,0; 0,5 mM PMSF) und einer erneuten Ultrazentrifugation für 1 Stunde wurden die Membranpellets in TG-Puffer [50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10% (v/v) Glycerol] resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Für die Herstellung von Cytosol aus *E. coli* Origami™ B (DE3)pLysS, transformiert mit pET32a-*trx-cadC*188-512 bzw. pET32a-*trx-cadC*188-512-R265C, wurden die Zellen in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7) 1 mM EDTA, 1 mM PMSF und 30 µg/mL DNase [0,2 g Zellen (Feuchtgewicht)/mL Aufschlusspuffer] resuspendiert. Der Aufschluss und die Ultrazentrifugation wurden wie für die Herstellung der Membranvesikel beschrieben durchgeführt. Das Cytosol wurde als Überstand nach der Ultrazentrifugation erhalten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Für die Herstellung von Cytosol aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*ravA* bzw. *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*viaA* bestand der Aufschlusspuffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 0,02% (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF und 30 µg/mL DNase. Da *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*ravA* nur schwer aufgeschlossen werden konnte, wurde die Kultur zunächst so verdünnt, dass die Optische Dichte bei 600 nm gleich 1 war. Für je 1 mL Kultur wurden dann jeweils 0,1 mL Aufschlusspuffer verwendet. *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*viaA* wurde in einer Konzentration von 0,1 g (Feuchtgewicht) Zellen/mL Puffer resuspendiert. Der Aufschluss und die Ultrazentrifugation wurden wie für die Herstellung des Cytosols aus *E. coli* Origami™ B (DE3)pLysS beschrieben durchgeführt.

2.5.2 Reinigung von Proteinen

2.5.2.1 Reinigung von Thioredoxin-CadC188-512 bzw. Thioredoxin-CadC188-512-R265C

Die Reinigung von Thioredoxin-CadC188-512 bzw. Thioredoxin-CadC188-512-R265C aus dem Cytosol von *E. coli* Origami™ B (DE3)pLysS, transformiert mit pET32a-*trx-cadC188-512* bzw. pET32a-*trx-cadC188-512-R265C*, erfolgte nach dem Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie mit Ni²⁺-NTA-Agarose. Hierfür wurde in der Regel 750 µL Ni²⁺-NTA-Agarose auf eine Reinigungssäule (Qiagen) geladen, mit H₂O gewaschen und mit 50 mL Reinigungspuffer (50 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7; 250 mM NaCl; 30 mM Imidazol) äquilibriert. Zur Bindung des gelösten Proteins wurde die äquilibrierte Agarose zu 25 mL Cytosol [nach Zugabe von NaCl (Endkonzentration: 250 mM) und Imidazol (Endkonzentration: 30 mM)] gegeben, in einem 50 mL-Falcon-Röhrchen vereinigt und 45 min bei 4°C auf einer Wippe geschwenkt. Nach Verwerfen der nicht-gebundenen Proteine und Waschen der Agarose mit 50 mL Waschpuffer (50 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7; 250 mM NaCl; 50 mM Imidazol) erfolgte die Elution von Trx-CadC188-512 bzw. Trx-CadC188-512-R265C 4 x mit je 1 mL Elutionspuffer (50 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 7; 250 mM NaCl; 250 mM Imidazol). Um für nachfolgende Experimente das Imidazol aus der Proteinlösung zu entfernen und die NaCl-Konzentration zu senken, wurde eine schrittweise Dialyse gegen 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7) und 150 mM NaCl bei 4°C durchgeführt. Gereinigtes Protein wurde bei 4°C gelagert.

2.5.2.2 Abspaltung von Thioredoxin durch Thrombin

Für die Abspaltung von Thioredoxin von Trx-CadC188-512 bzw. Trx-CadC188-512-R265C wurde das „Thrombin Cleavage and Capture Kit“ von Novagen verwendet. Hierfür wurde jeweils 1 U biotinyliertes Thrombin zu 1 mg Fusionsprotein gegeben und 4 h bei 20°C inkubiert. Die Proteinkonzentration im Ansatz betrug 1 mg/mL. Die Entfernung des biotinylierten Thrombins erfolgte mit Hilfe von Streptavidin-Agarose nach Anweisung des Herstellers. Für Kristallisationsversuche (2.5.2.3) wurde abgespaltenes Thioredoxin mittels Gelfiltration von CadC188-512 getrennt, für Tryptophanfluoreszenz-Messungen (2.5.10) wurde Thioredoxin mit Hilfe von Ultrafiltration (Ultrafree-4-Zentrifugationsgefäße, Größenausschlussgrenze der Membran: 30 kDa; Millipore, Bedford, USA) aus dem Ansatz entfernt.

2.5.2.3 Reinigung von CadC188-512 für Kristallisationsversuche

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Arne Skerra (Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München) wurden Versuche zur Strukturaufklärung von CadC188-512 mittels 3D-Kristallisation durchgeführt. Die Reinigung von Trx-CadC188-512 und anschließende Abspaltung von Thioredoxin erfolgte wie unter 2.5.2.1 und 2.5.2.2 beschrieben. Um für die Kristallisationsansätze das Thioredoxin aus der Proteinlösung zu entfernen, wurde CadC188-512 über eine analytische Superdex-Säule S-75 (25 mL Säulenvolumen; Pharmacia Amersham Äkta Prime) gereinigt. Die Säule wurde vor Auftragen des Proteins mit Laufpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) äquilibriert. Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,5 mL/min. Die Fraktionen, die CadC188-512 enthielten, wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration (Vivaspin-Zentrifugationsgefäße, Größenauschlussgrenze der Membran: 10 kDa; Sartorius, Hannover) auf ~ 10 mg/mL ankonzentriert und mit Hilfe eines Pipettier-Roboters (Tecan Freedom Evo®, Tecan) in 96 Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend wurden die Ansätze mit verschiedenen Fällungsreagenzien versetzt. Die Durchführung der Gelfiltration erfolgte am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München. Die Kristallisation wurde von Dr. Andreas Eichinger am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München durchgeführt, die Messung des Proteinkristalls erfolgte an der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY).

2.5.2.4 Solubilisierung und Reinigung von CadC für Kristallisationsversuche

Die Solubilisierung von Membranproteinen aus invertierten Membranvesikeln von *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET-16b-cadC wurde ähnlich durchgeführt wie bereits beschrieben (Küper, 2001), jedoch mit einem leicht veränderten Puffer. Die Membranvesikel wurden in einer Endkonzentration von 4-5 mg/mL Protein mit 2% (v/v) Lauryldimethylaminoxid (LDAO) in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl und 2 mM DTT solubilisiert. Dazu wurde eine 6,67%ige (v/v) Detergenzlösung innerhalb von 5 min schrittweise zum Solubilisierungsansatz gegeben, insgesamt wurde 30 min unter Rühren auf Eis solubilisiert. Anschließend wurde 1 h bei 244.000 x g (Sorvall®Discovery™ 90 SE oder Beckman Coulter Optima™ L-90K; 4°C) zentrifugiert, der Überstand enthielt die solubilisierten Proteine. Die Reinigung von CadC aus dem Solubilisat erfolgte nach dem Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie mit Ni²⁺-NTA-Agarose, hierfür wurden in der Regel 750 µL Ni²⁺-NTA-Agarose auf eine Reinigungssäule (Qiagen) geladen, mit H₂O gewaschen und mit Reinigungspuffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 2 mM DTT; 600 mM NaCl; 0,05 % (v/v) LDAO] äquilibriert. Zur

Bindung des gelösten Proteins wurde die äquilibrierte Agarose zu 25 mL Solubilisat [nach Zugabe von NaCl (Endkonzentration: 600 mM) und Imidazol (Endkonzentration: 30 mM)] gegeben, in einem 50 mL-Falcon-Röhrchen vereinigt und 45 min bei 4°C auf einer Wippe geschwenkt. Nach Verwerfen der nicht-gebundenen Proteine und Waschen der Matrix mit Reinigungspuffer wurde die Elution mit Reinigungspuffer, der 250 mM Imidazol enthielt, durchgeführt. Anschließend wurde CadC mittels Gelfiltration über eine analytische Sephadex-Säule S-200 (25 mL Säulenvolumen; Pharmacia Amersham Äkta Prime) am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München gereinigt. Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2 mM DTT, 300 mM NaCl und 0,05 % (w/v) LDAO verwendet. Die Säule wurde mit diesem Puffer äquilibriert, die Proteinlösung wurde vor dem Auftragen auf die Säule schrittweise gegen diesen Puffer dialysiert. Die Fraktionen, die CadC enthielten, wurden mit Hilfe von Ultrafiltration (Vivaspin-Zentrifugationsgefäße, Größenausschlussgrenze der Membran: 10 kDa; Sartorius, Hannover) ankonzentriert und zur Kristallisation eingesetzt. Die Gelfiltration und die Versuche zur Kristallisation erfolgten am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München.

Für die Quervernetzungsstudien bestand der Reinigungspuffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10% (v/v) Glycerol, 2 mM β -Mercaptoethanol, 300 mM NaCl, 0,04% (w/v) *n*-Dodecyl- β -D-maltosid und 30 mM Imidazol, für die Elution wurde die Konzentration an Imidazol im Reinigungspuffer auf 250 mM erhöht. Solubilisiertes und gereinigtes CadC wurde immer bei 4°C aufbewahrt.

2.5.2.5 Solubilisierung und Reinigung von LysP

Für die Quervernetzungsstudien erfolgte die Solubilisierung von LysP aus invertierten Membranvesikeln von *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pT-*lysP* wie unter 2.5.2.4 für CadC beschrieben, allerdings wurde als Solubilisierungspuffer 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10% (v/v) Glycerol, 2 mM β -Mercaptoethanol und 1% (w/v) *n*-Dodecyl- β -D-maltosid verwendet. Die Reinigung von LysP aus dem Solubilisat wurde ähnlich wie für CadC beschrieben durchgeführt (2.5.2.4), der Reinigungspuffer setzte sich jedoch aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10% (v/v) Glycerol, 2 mM β -Mercaptoethanol, 300 mM NaCl, 0,04% (w/v) *n*-Dodecyl- β -D-maltosid und 15 mM Imidazol zusammen. Für die Elution wurde die Imidazol-Konzentration im Reinigungspuffer auf 250 mM erhöht. Solubilisiertes und gereinigtes LysP wurde immer bei 4°C aufbewahrt.

2.5.2.6 Reinigung von RavA und ViaA

Die Reinigung von RavA bzw. ViaA aus dem Cytosol von *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*ravA* und *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*viaA* erfolgte nach dem Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie mit Ni²⁺-NTA-Agarose. Für die Reinigung von RavA wurden 400 mL Cytosol (ca. 640 mg Gesamtprotein) mit 6,4 mL Ni²⁺-NTA-Agarose inkubiert, um ViaA zu reinigen, wurden 120 mL Cytosol von *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*viaA* (Gesamtprotein ca. 580 mg Gesamtprotein) mit 5,8 mL Ni²⁺-NTA-Agarose inkubiert. Die Inkubation wurde 1 h bei 4°C durchgeführt, die Ni²⁺-NTA-Agarose wurde zuvor mit Reinigungspuffer [20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 0,02% (v/v) Triton X-100; 30 mM Imidazol; 1 mM PMSF] äquilibriert. Die Elution erfolgte mit Reinigungspuffer, der 250 mM Imidazol enthielt. Die gereinigten Proteine wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.3 Rekonstitution von CadC und LysP

Gereinigtes LysP bzw. CadC wurde gemäß der von Jung *et al.* (1997) abgewandelten Methode nach Rigaud *et al.* (1995) in Liposomen aus *E. coli*-Phospholipiden rekonstituiert. Bei dieser Detergenz-vermittelten Rekonstitution wurden die Liposomen durch Zugabe des Detergenz Triton X-100 [0,47% (v/v)] partiell solubilisiert. Anschließend wurde gereinigtes CadC (2.5.2.4) bzw. LysP (2.5.2.5) in einem Lipid:Protein-Verhältnis von 25:1 zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von BioBeads, um die Detergentien zu entfernen. Die BioBeads wurden in einem BioBeads:Detergenz-Verhältnis von 5:1 zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur (RT) gerührt, danach wurde noch einmal die gleiche Menge BioBeads zugegeben und eine weitere Stunde bei RT gerührt. Anschließend wurden über Nacht bei 4°C BioBeads in einem BioBeads:Detergenz-Verhältnis von 10:1 zugegeben. Dann wurde der Überstand abgenommen und 1 h bei 289000 x g zentrifugiert, das Pellet in TG-Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10% (v/v) Glycerol] resuspendiert, und die Proteoliposomen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Wurden LysP und CadC co-rekonstituiert, so wurde genauso vorgegangen, jedoch wurden beide Proteine gleichzeitig in einem äquimolaren Verhältnis mit den Liposomen in einem Lipid:Protein-Verhältnis von 25:1 inkubiert. Die Lagerung der Proteoliposomen erfolgte bei -80°C.

2.5.4 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen von Membranvesikeln und gereinigtem CadC wurde in Abwandlung des Protokolls von Lowry *et al.* (1951) nach Peterson (1977) durchgeführt. Als

Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (AppliChem) von 0 bis 25 µg verwendet, für die Bestimmung der Konzentration von rekonstituierten Proteinen wurde die Eichgerade mit 0 bis 5 µg BSA erstellt.

Die Konzentration von gereinigtem (Trx)-CadC188-512, (Trx)-CadC188-512-R265C, RavA und ViaA wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt.

Alternativ wurde die Konzentration von gereinigtem CadC188-512 mit Hilfe von UV-Absorption bestimmt. Hierbei ist die Absorption bei 280 nm

$$A_{280} = \epsilon * c * d$$

ϵ ist der Extinktionskoeffizient des Proteins in g/L, c ist die Konzentration des Proteins in g/L und d ist die Schichtdicke der Küvette in cm. Es wurden Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) der Firma Hellma (Müllheim) benutzt.

ϵ wurde mit Hilfe der Software DNAMAN (Version 5.2.9; Lynnon BioSoft) ermittelt und beträgt für CadC188-512 bei einer Wellenlänge von 280 nm 1,06 g/L.

2.5.5 Markierungsversuche mit PEG-Maleimid

Zum Nachweis der Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne von CadC wurde gereinigtes CadC188-512 mit *o*-(2-Maleimidoethyl)-*o'*-methyl-polyethylenglycol 5'000 (PEG-Maleimid) markiert. Es wurden jeweils 10 µg Protein mit 2% (w/v) SDS 30 min bei 37°C denaturiert, um eine effiziente Markierung zu gewährleisten. Zu einem Ansatz wurde zusätzlich das Reduktionsmittel Tris(2-carboxyethyl)phosphin-hydrochlorid (TCEP) in einer Konzentration von 1 mM zugefügt. Dann wurde zu jedem Ansatz 1 mM PEG-Maleimid gegeben und die Ansätze eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, der nicht mit PEG-Maleimid markiert wurde. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 20 µL. Zu den Proben wurde 1/5 des Volumens an 5 x SDS-Auftragspuffer ohne Reduktionsmittel gegeben [250 mM Tris/HCl (pH 6,8); 10% (w/v) SDS; 0,5% (w/v) Bromphenolblau; 50% (v/v) Glycerol] und diese auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen (2.5.7).

2.5.6 Quervernetzungsstudien

Für Quervernetzungsstudien wurden 5 µM rekonstituiertes CadC, 5 µM rekonstituiertes LysP und 10 µM co-rekonstituiertes CadC + LysP eingesetzt. Als Reaktionspuffer wurde 20 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,2) und 10% (v/v) Glycerol verwendet. Die unter 2.5.3 hergestellten Proteoliposomen wurden mehrmals mit diesem Puffer gewaschen und darin

resuspendiert. Zu den einzeln rekonstituierten Proteinen wurde jeweils 50 μM Disuccinimidylsuberat (DSS) gegeben, zu den co-rekonstituierten Proteinen 100 μM DSS. Die Ansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde die Reaktion mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) für 15 min bei Raumtemperatur abgestoppt. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels 7,5% SDS-PAGE (2.5.7). Als Negativkontrolle wurde CadC mit PutP (persönliche Gabe von D. Hilger) co-rekonstituiert und ebenfalls mit DSS inkubiert.

2.5.7 SDS-PAGE, Färbung von Proteinen und Berechnung von R_f -Werten

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Dazu wurden 0,8 mm dicke Flachgele der Größe 10 x 10 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 4,9%, im Trenngel 7,5-12,5%. Die Gele wurden mit Hilfe von Protogel-Fertiglösung [30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid; Biozym Diagnostik GmbH] hergestellt. Die Proben wurden vor dem Lauf mit SDS-Probenpuffer versetzt, so dass eine Endkonzentration von 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol und 0,005% (w/v) Bromphenolblau erzielt wurde. Als Standard wurde „High Molecular Weight“ oder „Prestained-High Molecular Weight“ (Sigma) oder SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard“ (Invitrogen) verwendet. Der Gellauf wurde in einem PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S (Peqlab) bei 200 V durchgeführt. Für den Nachweis einer Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne von CadC erfolgte der Gellauf bei konstant 100 V. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Serva Blau G-250 (Coomassie-Blau) nach Weber und Osborn (1969) detektiert, die Entfärbung der Gele erfolgte in 5% (v/v) Methanol und 7,5% (v/v) Essigsäure. Alternativ wurde eine sensitivere Detektion der Proteine mittels Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) erzielt.

Um unterschiedliches Laufverhalten während der Gelelektrophorese zwischen reduziertem und oxidiertem CadC188-512 zu ermitteln, wurden die R_f -Werte berechnet, also die relative Mobilität von Proteinen. Der R_f -Wert berechnet sich aus dem Quotienten der Strecke, die das Protein zurückgelegt hat und der Wegstrecke von Bromphenolblau.

2.5.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer Nassblot-Apparatur (Mini Trans-Blot Cell, BioRad) durch horizontale Elektrophorese für 120 min bei 300 mA, oder über Nacht bei 100 mA auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell; Porendurchmesser 0,45 μm) transferiert (Western Blot). Dafür wurden die Membran, das

Filterpapier und das Gel vorher kurz in Blotpuffer [25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol] inkubiert. Nach dem Blot wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde in TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) + 3% (w/v) BSA zur Absättigung unspezifischer Bindungen inkubiert. Als erster Antikörper wurde ein Penta-His-Antikörper in einer Endkonzentration von 1:2000 zugegeben und die Membran 1 h bei Raumtemperatur in TBS + 3% (w/v) BSA leicht geschwenkt. Als zweiter Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper in einer Endkonzentration von 1:5000 zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur in TBS + 3% BSA inkubiert. Der Immunoblot wurde durch Zugabe einer Färbe-Substratlösung [50 mM Natriumcarbonatpuffer (pH 9,5); 0,01% (w/v) Nitro-Blue-Tetrazolium; 0,045% (w/v) 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat] entwickelt.

2.5.9 DNA-Bindeexperimente

Gel-Retardations-Experimente wurden in Anlehnung an das Protokoll von Fried und Crothers (1981) wie bei Küper (2005) beschrieben durchgeführt. Das DNA-Fragment „Cad1-2“ wurde mit Hilfe der Oligonukleotide Cad5_sense und Cad6_anti mit genomischer DNA von *E. coli* MG1655 als Template amplifiziert. Die Markierung der DNA-Fragmente am 5'-Ende erfolgte wie unter 2.4.14 beschrieben. Für die Gel-Retardations-Experimente mit RavA bzw. ViaA wurden zwischen 0,1 und 1,41 pmol „Cad1-2“ mit 0 bis 10 µg der gereinigten Proteine in DNA-Bindepuffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 10% (v/v) Glycerol; 1 mM DTT] in einem Gesamtvolumen von 20 µL inkubiert. Als unspezifische Kompetitor-DNA wurde 1 µL Lachssperma-DNA (1 mg/mL) zugegeben. Die Inkubation erfolgte 10 min bei 37°C. Vor dem Gellauf wurden 3 µL „Sucrose-Dye-Solution“ [50% (w/v) Saccharose; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol] zu den Proben gegeben. Die Auftrennung von ungebundener DNA und von DNA-Protein-Komplexen erfolgte in einem 5% Polyacrylamidgel (37,5:1 Acryl:Bisacrylamid). Der Gellauf wurde für 1,5 bis 3 h bei konstant 110 V durchgeführt, als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE (44,5 mM Tris; 44,5 mM Borsäure; 1 mM EDTA) verwendet. Anschließend wurde das Gel 1,5 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Die Exposition erfolgte für ca. 2 h im Phosphorscreen.

2.5.10 Tryptophanfluoreszenz

Tryptophanfluoreszenz-Messungen mit CadC188-512 und CadC188-512-R265C wurden in einem FluoroMax-3 Spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon GmbH) bei 25 °C durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 287 nm, die Emission wurde zwischen 300 und 500 nm aufgenommen. Als Spaltbreite wurden 2 nm für die Anregung und 4 nm für die Emission

gewählt. Die Messungen wurden mit 0,1 mg/mL CadC188-512 bzw. CadC188-512-R265C in einem Gesamtvolumen von 250 μL (= 2,5 μM Protein) in 150 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7 und pH 5,8) und 150 mM NaCl durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Versuch gegen diesen Puffer dialysiert, der jeweilige Ligand war in einer konzentrierten Lösung in Dialysepuffer gelöst. Aus der konzentrierten Ligandlösung wurde jeweils 1,25 μL zur Proteinlösung titriert, so dass sich die Konzentration des Liganden im Versuchsansatz schrittweise erhöhte. Nach Zugabe des Liganden wurde der Ansatz jeweils 5 min bei 25°C inkubiert. Veränderungen in der Fluoreszenz sind als $\Delta F/F$ dargestellt, wobei F die maximale Fluoreszenz bei 337 nm ist, ΔF ist die Fluoreszenzveränderung bei 337 nm nach Ligandzugabe. Um unspezifische Veränderungen zu detektieren, wurden für die Versuche zur Lysin-Affinität L-Alanin und für die Versuche zur Cadaverin-Affinität Spermidin als Negativkontrollen verwendet. Die $\Delta F/F$ -Werte der Negativkontrollen wurden von den entsprechenden Werten, die mit Lysin bzw. Cadaverin erhalten wurden, abgezogen. Als weitere Negativkontrolle wurden die Versuche zusätzlich mit Dialysepuffer ohne Ligand durchgeführt, hierbei wurde schrittweise 1,25 μL Puffer zum Protein gegeben.

Die Affinitätskonstante K_D wurde aus der Steigung des Plots $\Delta F/F$ (= gebundener Ligand) gegen $(\Delta F/F)/[L]$ (= Quotient aus gebundenem und freien Liganden) nach Scatchard (1949) mit Hilfe der Software SigmaPlot (Version 9.0; Systat Software) berechnet.

2.5.11 Isothermale Titrationskalorimetrie

Für die Affinitätsbestimmungen mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie wurde CadC produziert, solubilisiert und gereinigt wie bereits beschrieben (Küper, 2001). Das gereinigte Protein wurde vor den Messungen schrittweise gegen 50 mM Natrium-Phosphat Puffer (pH 5,8), 10% (v/v) Glycerol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 600 mM NaCl und 0,2% (v/v) LDAO dialysiert. Die Messungen wurden mit einem VP-ITC Microcalorimeter (MicroCal Inc.) am Max-Planck-Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. L. Moroder (Bioorganische Chemie) durchgeführt. CadC wurde in einer Konzentration von 16 μM eingesetzt (Gesamtvolumen 1,4 mL). Lysin, gelöst in Dialysepuffer, wurde schrittweise aus einer Stammlösung (10 mM) zum Protein titriert (je 10 μL , 29x). Die Messungen wurden bei 20°C durchgeführt, während des Versuchs wurde die Lösung in der Probenzelle bei 310 rpm gerührt. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der vom Hersteller des Instruments mitgelieferten Origin Software analysiert und die Affinitätskonstante K_D bestimmt.

2.5.12 β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung

β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden nach dem Protokoll von Miller bestimmt (Miller, 1972). Für den Test wurden jeweils 1 mL Zellkultur bei 16100 x g abzentrifugiert und in 1 mL Puffer Z (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 50 mM β -Mercaptoethanol; pH 7,0) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 100 μ L Chloroform und 50 μ L 0,1% (v/v) SDS permeabilisiert. Zur Bestimmung der Aktivität wurden 200 μ L ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (4 mg/mL) zu den Proben gegeben. Die Reaktion wurde nach 1-5 min durch Zugabe von 0,5 mL Natriumcarbonat (1 M) abgestoppt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 16100 x g für 10 min entfernt. Die Intensität der durch die Reaktion hervorgerufenen Färbung wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt. Die Aktivität wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\beta\text{-Galaktosidase-Aktivität [Miller-Units]} = \frac{(A_{420} * 1000)}{(t [\text{min}] * V [\text{mL}] * OD_{600})}$$

Dabei sind A₄₂₀ die Absorption der Reaktionslösung bei 420 nm, t die Reaktionszeit in Minuten, V das Probenvolumen in mL und OD₆₀₀ die Optische Dichte (bei 600 nm) der Zellsuspension bei der Zellernte.

2.5.13 Lysin-Decarboxylase-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der spezifischen Lysin-Decarboxylase-Aktivität erfolgte wie bereits beschrieben (Phan *et al.*, 1982; Lemmonier und Lane, 1998). In einem typischen Experiment wurden Zellen aus 10 mL Zellsuspension durch 5-minütige Zentrifugation bei 5000 x g sedimentiert, in 1 mL Aufschlusspuffer [10 mM Natrium-Acetat (pH 6); 10% (v/v) Glycerol; 1 mM EDTA; 10 mM β -Mercaptoethanol; 0,1 mM Pyridoxalphosphat) resuspendiert und in Gegenwart von 0,1 mg Lysozym 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Ultraschallbehandlung mit einem Modell 250 der Firma Branson aufgeschlossen und Zelltrümmer durch 15-minütige Zentrifugation bei 16100 x g entfernt. Der Proteingehalt des zellfreien Extrakts wurde mittels einer Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) ermittelt. Für die Aktivitätsbestimmung wurden 5 μ g Protein des zellfreien Extrakts zu 50 μ L LDC-Puffer (16 mM Kalium-Phosphat (pH 5,8); 10 mM Lysin; 0,1 mM Pyridoxalphosphat) gegeben und der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 120 μ L Na₂CO₃ (1 M) abgestoppt und entstandenes Cadaverin und noch vorhandenes

Lysin durch Zugabe von 120 μL Tri-Nitro-Benzolsulfonsäure (TNBS; 10 mM) für 4 Minuten bei 40°C derivatisiert. TNBS-Cadaverin wurde mit 1 mL Toluol extrahiert und die Absorption der organischen Phase bei 340 nm in Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) photometrisch bestimmt.

Alternativ wurde eine verkürzte Version des Tests durchgeführt. Hierfür wurde jeweils 1 mL der Zellkultur bei 16100 x g abzentrifugiert und das Pellet in 20 mM Kalium-Phosphat (pH 5,6) resuspendiert, so dass eine Optische Dichte bei 600 nm von 1 erreicht wurde. 200 μL der Zellsuspension wurden durch Zugabe von 20 μL Chloroform permeabilisiert. Hiervon wurden 10 μL in 120 μL LDC-Puffer gegeben und der Versuch wie oben beschrieben durchgeführt.

Um die TNBS-Cadaverin-Konzentration in den Proben zu bestimmen, wurde eine TNBS-Cadaverin-Standardkurve erstellt. Im linearen Bereich dieser Kurve entspricht eine Absorption von 1 bei 340 nm ca. 106 nmol Cadaverin. Die spezifische Lysin-Decarboxylase-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische Aktivität} = \mu\text{mol Cadaverin} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$$

2.5.14 Bestimmung der extrazellulären Cadaverin-Konzentration

Die extrazelluläre Cadaverin-Konzentration wurde durch photometrische Bestimmung nach Derivatisierung mit TNBS bestimmt. Die photometrische Bestimmung beruht auf der Methode nach Phan *et. al* (1982). Es wurden 10 μL Kulturüberstand (bzw. 20 μL bei Kultivierung der Zellen ohne Lysin) mit Wasser auf 50 μL aufgefüllt, mit 120 μL Na_2CO_3 (1 M) und 120 μL TNBS (10 mM) versetzt und für 4 Minuten bei 40°C inkubiert. TNBS-Cadaverin wurde mit 1 mL Toluol extrahiert und die Absorption der organischen Phase bei 340 nm in Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) photometrisch bestimmt. Die TNBS-Cadaverin-Konzentration wurde anhand einer TNBS-Cadaverin-Eichgerade (0 bis 500 nmol) ermittelt.

2.6 Mathematische Modellierung des Cad-Systems

Sämtliche Gleichungen des mathematischen Modells des Cad-Systems wurden von Prof. Dr. Ulrich Gerland und Georg Fritz vom Institut für Theoretische Physik der Universität zu Köln erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Transkriptions- und Translationsanalyse des Cad-Systems von *E. coli*

In dieser Arbeit sollte zunächst ein allgemeiner Überblick über die Funktion des Cad-Systems auf Transkriptionsebene und auf Translationsebene gewonnen werden. Dazu wurden verschiedene Komponenten des Cad-Systems detailliert untersucht, nämlich die Expression von *cadBA*, die relative Menge der Lysin-Decarboxylase CadA in den Zellen und die Exkretion von Cadaverin durch CadB. Für diese Analyse wurden verschiedene *E. coli* MG1655-Mutanten wie unter 2.3.2 beschrieben zunächst unter nicht-induzierenden Bedingungen (Zeitpunkt t_{-30} ; pH 7,6, aerob) kultiviert und anschließend unter induzierenden Bedingungen (Zeitpunkt t_0 ; pH 5,8, mikroaerob, mit bzw. ohne 10 mM Lysin) 4 h weiterkultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben (Zellen und Kulturüberstand) entnommen und analysiert, außerdem erfolgte die Bestimmung der Optischen Dichte, der Lebendzellzahl und des pH-Wertes. Zusätzlich sollte die Funktion des negativen Regulators LysP charakterisiert werden, wobei vor allem die Rolle von Lysin bei der Aktivierung des Cad-Systems untersucht wurde. Hierfür musste zunächst eine *lysP*-Mutante von *E. coli* MG1655 konstruiert werden. Außerdem wurde das Cad-System in einem $\Delta ravA/\Delta viaA$ -Stamm (Snider *et al.*, 2006) untersucht. Mit Hilfe der erhaltenen Daten wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulrich Gerland und Georg Fritz vom Institut für Theoretische Physik der Universität zu Köln ein mathematisches Modell für das Cad-System in *E. coli* erstellt.

3.1.1 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655 (Wildtyp)

Für die zeitabhängige Charakterisierung des Cad-Systems wurde der *E. coli* K12-Referenzstamm MG1655 (Wildtyp) verwendet (Blattner *et al.*, 1997). Mit diesem wurden bereits einzelne Parameter des Cad-Systems untersucht und in ein mathematisches Modell integriert (Gonzalez *et al.*, 2007), wobei die früheren Messreihen für eine Kultivierung in Vollmedium aufgenommen wurden. Da besonders auch die Rolle von Lysin von Interesse war, wurden die Versuche in der vorliegenden Arbeit in einem Phosphat-gepufferten Minimalmedium (Epstein und Kim, 1971) durchgeführt.

Für die Transkriptionsanalyse wurde die Gesamt-RNA präpariert und die relative Menge an *cadBA*-mRNA durch Northern-Blot-Analysen bestimmt. Bereits 5 min nach Beginn der Induktion konnte *cadBA*-mRNA detektiert werden, die Transkriptmenge stieg dann deutlich an, wobei die höchste Expression des *cadBA*-Operons zwischen 20 und 30 min zu

verzeichnen war. Die maximale Induktion der *cadBA*-Expression wurde nach 25 min gemessen (68fache Induktion im Vergleich zur Probe von t_{-30}), anschließend erfolgte ein rascher Rückgang der Menge an *cadBA*-mRNA bis nach 90 min kein Transkript mehr nachweisbar war (Abb. 4A und 4B).

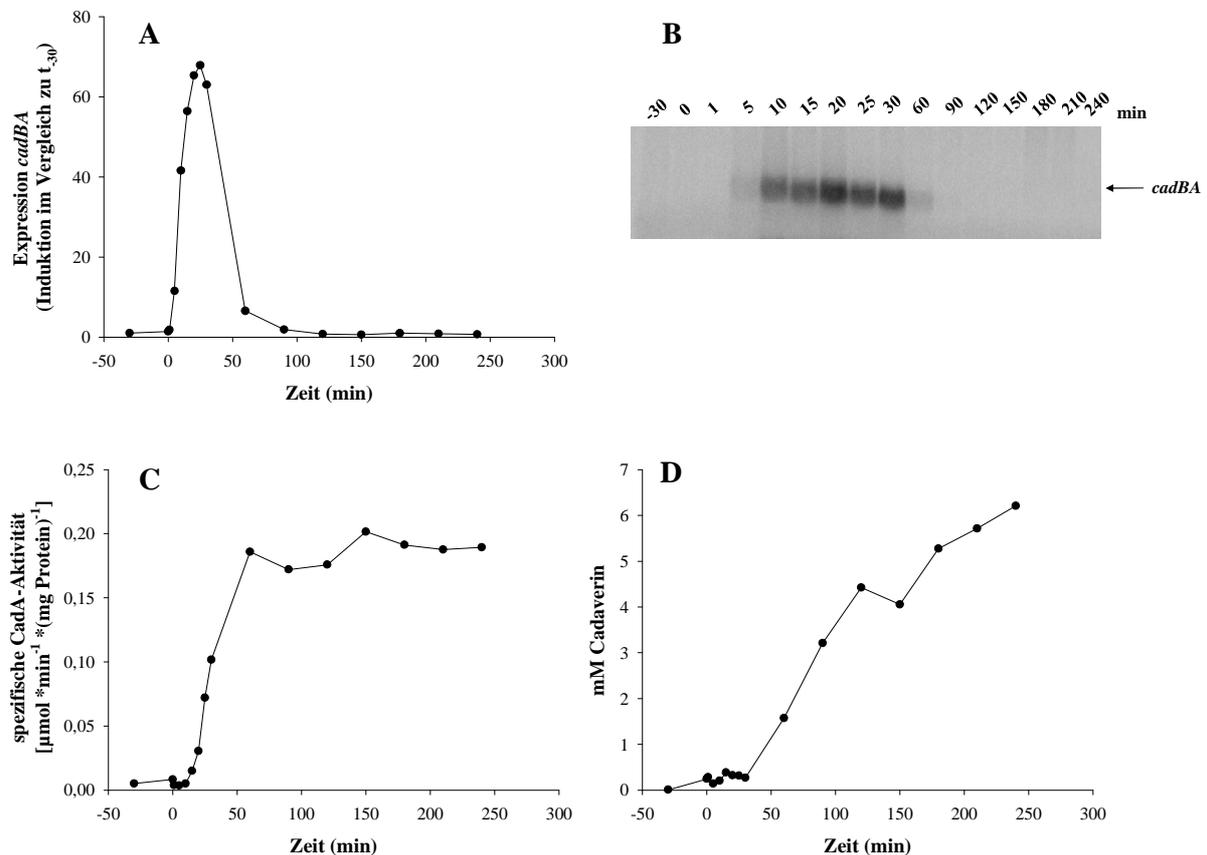


Abb. 4: Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655 (Wildtyp)

E. coli MG1655 wurde bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase aerob in KE-Medium (pH 7,6) kultiviert. Dann wurden die Zellen in KE-Medium (pH 5,8) mit 10 mM Lysin überführt und unter mikroaeroben Bedingungen weitere 4 h inkubiert. Zu den in der Abbildung gezeigten Zeitpunkten wurden jeweils Proben entnommen und die Aktivität des Cad-Systems anhand verschiedener Parameter analysiert.

A: Quantifizierung der *cadBA*-mRNA mit der Software ImageQuant (Version 5.0; Molecular Dynamics).

B: Autoradiogramm des Northern Blots, als Sonde wurde radioaktiv markierte *cadBA*-DNA verwendet.

C: Messung der spezifischen CadA-Aktivität in zellfreien Extrakten.

D: Messung von extrazellulärem Cadaverin nach Derivatisierung mit TNBS.

Um die relative Menge an CadA in den Zellen *in vivo* zu ermitteln, wurde die spezifische CadA-Aktivität in zellfreien Extrakten gemessen. 20 min nach Beginn der Induktion stieg die spezifische CadA-Aktivität an und erreichte nach 60 min ein Maximum, welches bis zum Ende des Experiments ungefähr gleich blieb [spezifische Aktivität zwischen $0,17$ und $0,20 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$; Abb. 4C].

Das durch die CadA-Aktivität gebildete Cadaverin, welches durch CadB nach außen transportiert wurde, war in den ersten Minuten nach Beginn der Induktion in geringen Konzentrationen vorhanden (0,24 mM), nach ca. 30 min stieg die Konzentration im Kulturüberstand deutlich an, bis nach 240 min eine maximale Konzentration von 6,21 mM gemessen wurde (Abb. 4D).

Die zeitabhängige Charakterisierung des Cad-Systems in *E. coli* MG1655 ergab somit eine transiente *cadBA*-Expression, die rasch beendet wurde, obwohl weiterhin induzierende Bedingungen vorlagen. Die spezifische CadA-Aktivität stieg nach der Induktion an, erreichte dann ein Maximum und blieb im weiteren Verlauf des Experiments stabil, gleichzeitig wurde eine konstante Zunahme der Cadaverin-Konzentration im Kulturüberstand gemessen. Die hier erhaltenen Daten wurden verwendet, um das Cad-System in *E. coli* MG1655 mit Hilfe eines mathematischen Modells quantitativ zu beschreiben (siehe 3.1.4).

3.1.2 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in einem *lysP*-negativen *E. coli* MG1655

Um die Rolle der Lysin-Permease LysP bei der Regulation des Cad-Systems zu analysieren, wurde zunächst ein MG1655-Stamm mit einem nicht-funktionellen LysP konstruiert. Um einen *lysP*-negativen-Stamm zu erhalten, wurde eine ungerichtete Mutagenese mit Hilfe des toxischen Lysin-Analogons Thiosin (S-Aminoethylcystein) durchgeführt (2.4.10). Thiosin hemmt das Wachstum verschiedener Mikroorganismen bei Abwesenheit von Lysin. So wird in *E. coli* beispielsweise die Lysin-Aufnahme durch Thiosin gehemmt, sowohl durch die Lysin-spezifische Permease LysP als auch durch das LAO-System, das Lysin, Arginin und Ornithin transportiert (Rosen, 1971a; Halsall, 1975). Des Weiteren wird die Proteinsynthese gestört, da Thiosin Lysin bei der Aminoacylierung von tRNA ersetzt (Stern und Mehler, 1965), außerdem wurde eine Veränderung der Menge an Lysyl-tRNA-Synthetase beschrieben (Hirschfield *et al.*, 1975; Hirschfield und Zamecnik, 1972). Thiosin eignet sich sehr gut zur Selektion von *lysP*-Mutanten, da spontane Mutationen in *lysP* dazu führen, dass Thiosin nicht mehr aufgenommen werden kann und Wachstum in Gegenwart dieses Toxins möglich ist. Thiosin-resistente Mutanten zeichnen sich durch einen erniedrigten Lysin-Transport, eine erhöhte Lysin-Decarboxylase-Aktivität und eine Lysin-unabhängige *cadBA*-Expression aus (Popkin und Maas, 1980; Tabor *et al.*, 1980; Neely *et al.*, 1994).

3.1.2.1 Isolierung von *E. coli* MG1655-*lysP211*

Die Sequenzanalyse eines Thiosin-resistenten *E. coli* MG1655-Derivates (Wachstum in Gegenwart von 100 µg/mL Thiosin; Abb. 5A) ergab einen Basenaustausch in Nukleotid 211 (G → T) in *lysP*, der zu einem frühzeitigen Stopp-Codon (anstelle von Glutamat) führte, was in einer stark verkürzten und inaktiven Form von LysP resultierte (70 Aminosäuren, Abb. 5C). Der Thiosin-resistente Stamm wurde als *E. coli* MG1655-*lysP211* bezeichnet. Um sicher zu stellen, dass die Thiosin-Resistenz ausschließlich auf der Mutation in *lysP* beruhte, wurde MG1655-*lysP211* mit pT-*lysP* (kodiert für ein funktionelles LysP) transformiert. Dadurch kam es zu einem Verlust der Resistenz, durch die Transformation mit pT-*lysP242* (kodiert für ein verkürztes, nicht funktionelles LysP) wurde die Resistenz gegenüber Thiosin jedoch beibehalten (Abb. 5B).

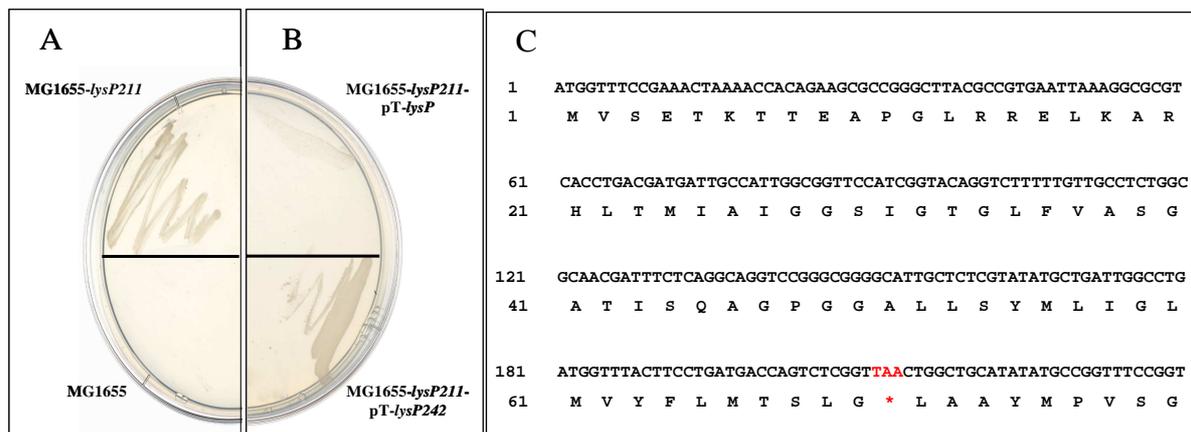


Abb. 5: Selektion von *E. coli* MG1655-*lysP211* mit Hilfe von Thiosin

A: Wachstum von *E. coli* MG1655 (WT) und *E. coli* MG1655-*lysP211* in KE-Medium in Gegenwart von 100 µg/mL Thiosin.

B: Komplementation der Resistenz gegenüber Thiosin nach Transformation von *E. coli* MG1655-*lysP211* mit pT-*lysP* bzw. pT-*lysP242* (KE-Medium, 100 µg/mL Thiosin, 100 µg/mL Ampicillin).

C: Ausschnitt aus der Basensequenz von *lysP* aus MG1655-*lysP211* und Translation der Sequenz. Dargestellt sind die ersten 240 bp der Sequenz. Die Übersetzung der Basensequenz wurde mit Hilfe der Software DNAMAN (Version 5.2.9; Lynnon BioSoft) durchgeführt. Der Austausch der Base G zu T an Position 211 resultierte in der Einführung eines frühzeitigen Stopp-Codons (TAA, rot gekennzeichnet) und somit in einem inaktiven LysP.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass das vorzeitige Stopp-Codon nicht erkannt wird, und weitere Basenaustausche, die in der Sequenz detektiert werden konnten, die Resistenz von *E. coli* MG1655-*lysP211* gegenüber Thiosin bedingten, erfolgte die Klonierung von *lysP211* in den Expressionsvektor pT7-5 (Tabor und Richardson, 1985).

Am 3`-Ende von *lysP211* wurde eine für einen His-Tag-kodierende Basensequenz eingefügt. Mittels Western Blot wurde der C-terminale His-Tag von LysP aus *E. coli* MG1655, das als Kontrolle diente, nachgewiesen, nicht aber bei LysP211. Somit wurde der C-terminale Teil von LysP211 aufgrund des vorzeitigen Stopp-Codons nicht gebildet, dies zeigte, dass es sich bei LysP211 tatsächlich um ein stark verkürztes Protein handelte (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.2 Phänotypische Charakterisierung von *E. coli* MG1655-*lysP211*

Eine erste Charakterisierung von *E. coli* MG1655-*lysP211* wurde über die Bestimmung der spezifischen CadA-Aktivität aus zellfreien Extrakten als Maß für die Expression des *cadBA*-Operons erzielt. Hierzu wurden die Zellen in Phosphat-gepuffertem Minimalmedium (Epstein und Kim, 1971) mikroaerob bei pH 7,6 bzw. 5,8 bis zu Beginn der stationären Wachstumsphase kultiviert, anschließend wurden Proben entnommen und die spezifische CadA-Aktivität wie unter 2.5.13 beschrieben bestimmt.

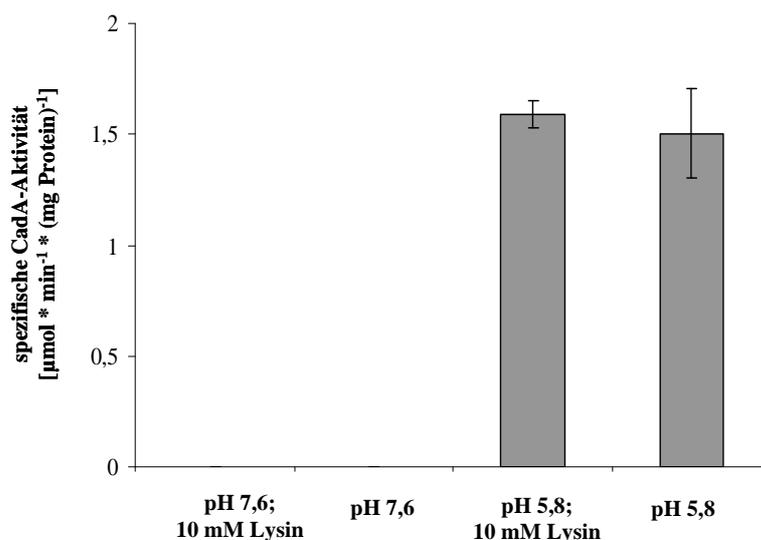


Abb. 6: *cadBA*-Expression in *E. coli* MG1655-*lysP211* in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen

E. coli MG1655-*lysP211* wurde in Minimalmedium mikroaerob bei pH 5,8 bzw. pH 7,6 bis zu Beginn der stationären Phase kultiviert und anschließend die spezifische CadA-Aktivität als Maß für die *cadBA*-Expression bestimmt. Dem Medium wurden -wenn angegeben - 10 mM Lysin zugefügt.

Wurde *E. coli* MG1655-*lysP211* bei pH 7,6 kultiviert, so wurde unter keinen Bedingungen spezifische CadA-Aktivität gemessen. Erfolgte die Kultivierung jedoch bei pH 5,8, so war kein Lysin im Wachstumsmedium nötig, um die *cadBA*-Expression zu induzieren (Abb. 6). Bei Wachstum in Gegenwart von 10 mM Lysin wurde eine spezifische CadA-Aktivität von $1,59 (\pm 0,06) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ gemessen, ohne Lysin betrug die spezifische

Aktivität $1,50 (\pm 0,20) \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$. Die Lysin-unabhängige Expression des *cadBA*-Operons entsprach dem Phänotyp bereits isolierter *lysP*-Mutanten (Popkin und Maas, 1980; Tabor *et al.*, 1980; Neely *et al.*, 1994).

3.1.2.3 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655-*lysP211*

Zunächst wurde die zeitabhängige Aktivität des Cad-Systems in *E. coli* MG1655-*lysP211* in Minimalmedium (Epstein und Kim, 1971) mit 10 mM Lysin analysiert, also Bedingungen, bei denen *E. coli* Wildtyp-Stämme ein aktives Cad-System aufweisen. Wurden die Zellen zu induzierenden Bedingungen überführt, so konnte bereits nach 1 min *cadBA*-Transkript detektiert werden. Die höchste Expression des *cadBA*-Operons war nach 15 min zu verzeichnen, wobei die Induktion der Transkription (im Vergleich zur Probe von t_{30}) 120fach war (Abb. 7A und 7B) und somit im Vergleich zum Wildtyp um einen Faktor von 1,8 höher. Auch verlief das Abschalten der Transkription langsamer, erst nach 120 min wurde annähernd kein Transkript mehr detektiert (vgl. Abb. 4A und 4B).

20 min nach Beginn der Induktion konnte spezifische CadA-Aktivität detektiert werden, welche zunahm und ab ca. 60 min bis zum Ende des Experiments ungefähr gleich blieb [spezifische Aktivität $\sim 0,3 \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$; Abb. 7C]. Die maximale spezifische CadA-Aktivität war höher als beim Wildtyp (vgl. Abb. 4C). Insgesamt war die spezifische CadA-Aktivität relativ niedrig im Vergleich zu den Werten, die bei der phänotypischen Charakterisierung von *E. coli* MG1655-*lysP211* gemessen wurden (vgl. Abb. 6), dies lag vermutlich an den Kultivierungsbedingungen der Kulturen, da bei diesem Experiment bereits eine längere Adaptation der Zellen an die induzierenden Bedingungen stattgefunden hatte.

Etwa 30 min nach Beginn der Induktion stieg die Cadaverin-Konzentration im Kulturüberstand an, die maximal gemessene extrazelluläre Konzentration war nach 240 min 9,14 mM (Abb. 7D) und somit höher als die Konzentration im Wildtyp (vgl. Abb. 4D).

Um die Rolle des Induktors Lysin zu analysieren, wurde der gleiche Versuch ohne Lysin im Wachstumsmedium durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnten bereits 5 min nach Beginn der Induktion geringe Mengen *cadBA*-mRNA detektiert werden. Die Transkriptmenge stieg dann an und blieb zwischen 30 und 60 min relativ gleich. Im Vergleich zu t_{30} war eine ca. 76fache Induktion der Transkription zu verzeichnen. Danach nahm die Transkriptmenge ab, nach 150 min war kaum mehr *cadBA*-mRNA nachweisbar (Abb. 7A und 7B).

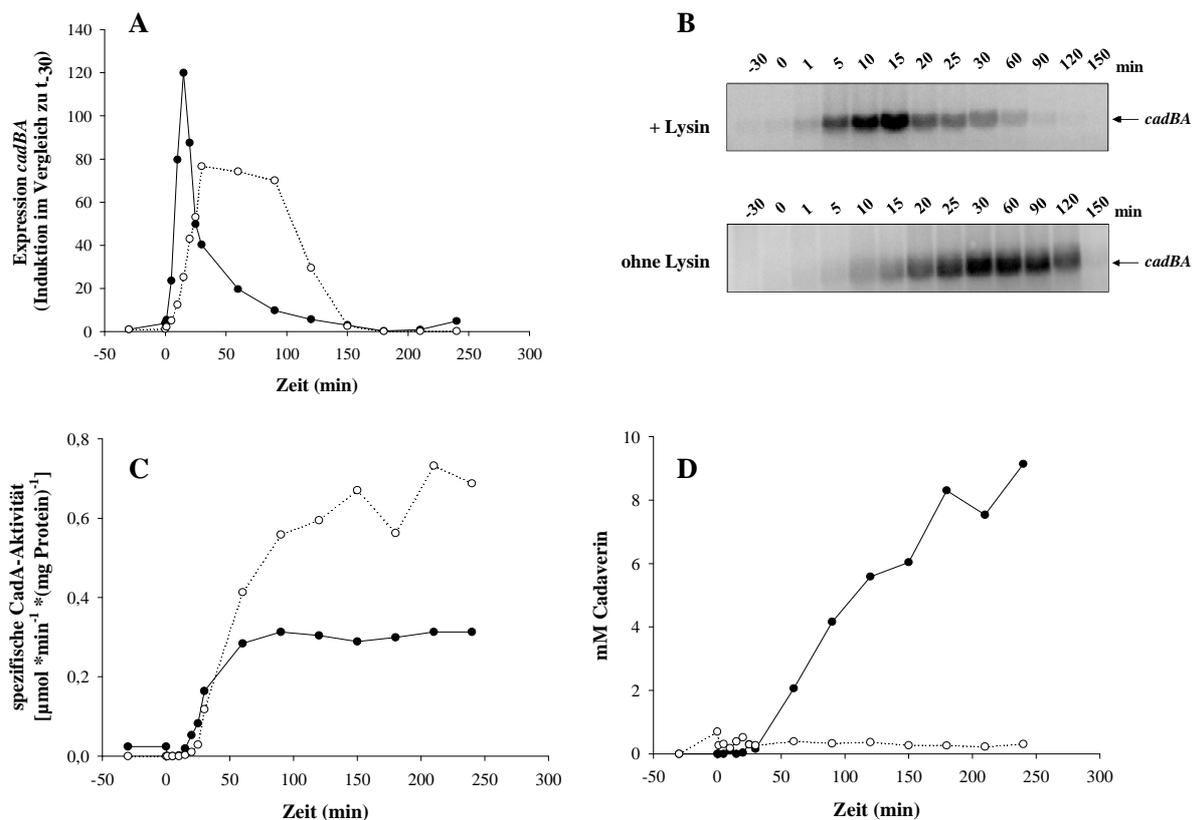


Abb. 7: Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655-lysP211

E. coli MG1655-lysP211 wurde bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase aerob in KE-Medium (pH 7,6) kultiviert. Dann wurden die Zellen in KE-Medium (pH 5,8) mit 10 mM Lysin (—●—) bzw. ohne Lysin (---○---) überführt und unter mikroaeroben Bedingungen weitere 4 h inkubiert. Zu den in der Abbildung gezeigten Zeitpunkten wurden jeweils Proben entnommen und die Aktivität des Cad-Systems anhand verschiedener Parameter analysiert.

A: Quantifizierung der *cadBA*-mRNA mit der Software ImageQuant (Version 5.0; Molecular Dynamics).

B: Autoradiogramm des Northern Blots bis Zeitpunkt t_{150} , als Sonde wurde radioaktiv markierte *cadBA*-DNA verwendet.

C: Messung der spezifischen CadA-Aktivität in zellfreien Extrakten.

D: Messung von extrazellulärem Cadaverin nach Derivatisierung mit TNBS.

25 min nach Induktionsbeginn wurde spezifische CadA-Aktivität detektiert, die im Laufe des Experiments zunahm, ab dem Zeitpunkt t_{120} blieb die spezifische Aktivität bis zum Ende des Experiments jedoch relativ konstant [zwischen $0,56$ und $0,73 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$]. Die spezifische CadA-Aktivität war somit bei Wachstum der Zellen ohne Lysin um einen Faktor ~ 2 höher als bei Wachstum in Gegenwart von 10 mM Lysin.

Extrazelluläres Cadaverin konnte nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden, wobei es sich hierbei, aufgrund des Testsystems, theoretisch auch um eine andere mit TNBS-derivatisierbare Substanz, welche die Zellen in das extrazelluläre Medium transportierten, handeln könnte. Zum Zeitpunkt t_{30} war kein Cadaverin detektierbar, sofort nach Beginn der

Induktion wurde ein Wert von 0,7 mM erreicht, der dann wieder leicht absank. Während des gesamten Experiments war ein Basallevel an Cadaverin um ~ 0,3 bis 0,4 mM messbar (Abb. 7D).

In *E. coli* MG1655-*lysP211* war bei Wachstum in Gegenwart von Lysin die *cadBA*-Transkription, ähnlich wie bei *E. coli* MG1655, transient angeschaltet, bei Wachstum ohne Lysin hingegen konnte über einen längeren Zeitraum *cadBA*-mRNA nachgewiesen werden. Die spezifische CadA-Aktivität stieg nach der Induktion an und blieb im weiteren Verlauf des Experiments relativ stabil, unabhängig vom Vorhandensein von Lysin im Wachstumsmedium, die maximale spezifische CadA-Aktivität war jedoch deutlich höher, wenn kein Lysin im Medium war. Wie bei *E. coli* MG1655 wurde bei Vorhandensein von Lysin eine stetige Zunahme an Cadaverin im Kulturüberstand gemessen.

3.1.3 RavA, ein Transkriptionsaktivator des Cad-Systems?

Die AAA⁺-ATPase RavA bildet einen Komplex mit der Lysin-Decarboxylase CadA (Snider *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob RavA eine Rolle bei der Regulation des Cad-Systems spielt. Dies sollte zum einen *in vivo* über Transkriptions- und Translationsanalysen mit dem Stamm *E. coli* MG1655 Δ *ravA* erfolgen. Dieser Stamm ist gleichzeitig *viaA*-negativ, da *viaA* zusammen mit *ravA* in einem Operon vorliegt. *viaA* kodiert für ein Protein mit einer sog. „Von Willebrand Faktor Typ A Domäne (Snider *et al.*, 2006). Zum anderen sollte *in vitro* untersucht werden, ob gereinigtes RavA oder ViaA an die CadC-Bindestelle des *cadBA*-Operons binden können und somit als Transkriptionsregulatoren dieses Operons fungieren.

3.1.3.1 Transkriptions- und Translationsanalyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655 Δ *ravA*

Zunächst wurde die *cadBA*-Expression in *E. coli* MG1655 Δ *ravA* im Vergleich zu *E. coli* MG1655 in Abhängigkeit verschiedener Wachstumsbedingungen untersucht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben, die Transkriptionsanalyse wurde wie unter 2.4.13 beschrieben durchgeführt.

Wie beim Wildtyp konnte bei *E. coli* MG1655 Δ *ravA* *cadBA*-mRNA in größeren Mengen nur nachgewiesen werden, wenn sowohl ein niedriger pH-Wert als auch 10 mM Lysin vorlagen (Abb. 8). Jedoch wurde in *E. coli* MG1655 Δ *ravA* nur 69 % der in *E. coli* MG1655 detektierten *cadBA*-mRNA gemessen, das Fehlen von RavA und/oder ViaA hatte somit eine verminderte Expression des *cadBA*-Operons zur Folge.

Die Transformation von *E. coli* MG1655 Δ *ravA* mit einem Plasmid, das für RavA und ViaA kodiert, konnte diesen Phänotyp komplementieren (Korinna Burdack, persönliche Mitteilung).

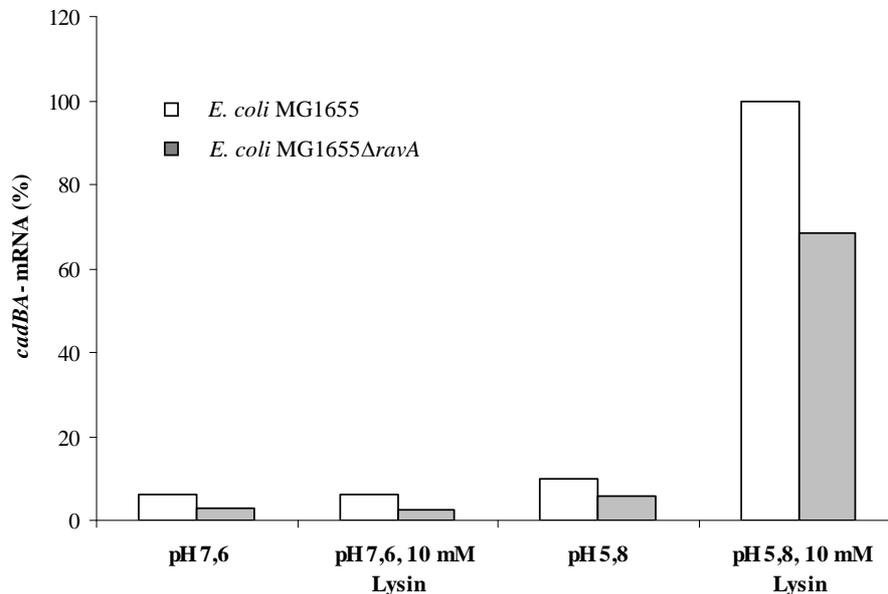


Abb. 8: Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die *cadBA*-Expression in *E. coli* MG1655 und *E. coli* MG1655 Δ *ravA*

E. coli MG1655 und *E. coli* MG1655 Δ *ravA* wurden bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase aerob in KE-Medium (pH 7,6) kultiviert. Dann wurden die Zellen in KE-Medium, pH 5,8 (+/- 10 mM Lysin) bzw. pH 7,6 (+/- 10 mM Lysin) überführt und unter mikroaeroben Bedingungen weiter inkubiert. 25 min nach dem Überführen der Zellen wurden jeweils Proben entnommen und die Menge an *cadBA*-mRNA mittels Northern Blot-Analyse untersucht. Als Sonde wurde radioaktiv markierte *cadBA*-DNA verwendet, der höchste gemessene Wert (MG1655, pH 5,8, 10 mM) wurde als 100% definiert. Zur Quantifizierung der *cadBA*-mRNA wurde die Software ImageQuant (Version 5.0; Molecular Dynamics) verwendet.

Um einen genaueren Einblick in die Art der Regulation des Cad-Systems durch RavA/ViaA zu erhalten, wurde eine zeitabhängige Transkriptions- und Translationsanalyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655 Δ *ravA* durchgeführt.

Ähnlich wie beim Wildtyp stieg die Transkriptionsrate des *cadBA*-Operons 5 min nach Beginn der Induktion an, die maximale Menge an *cadBA*-mRNA war zwischen 20 und 30 min detektierbar (Abb. 9A und 9B). Das Absinken der Transkriptmenge zum Zeitpunkt t_{25} war wahrscheinlich nicht physiologisch bedingt. Jedoch war die Menge an detektierbarer *cadBA*-mRNA relativ gering. Die maximale Induktion der *cadBA*-Expression war 30fach im Vergleich zu Zeitpunkt t_{30} , war also deutlich geringer als beim Wildtyp (vgl. Abb. 4A und 4B). Anschließend erfolgte ein rasches Abschalten der Transkription, nach 90 min war annähernd kein Transkript mehr nachweisbar.

Spezifische CadA-Aktivität war 25 min nach Induktionsbeginn in geringem Maß nachweisbar, nach 60 min wurde ein Maximum an spezifischer CadA-Aktivität gemessen. Im weiteren Verlauf des Versuchs blieb die spezifische Aktivität ungefähr gleich [zwischen 0,12 und 0,15 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$; Abb. 9C], war jedoch um einen Faktor von $\sim 1,4$ niedriger als beim Wildtyp (vgl. Abb. 4C).

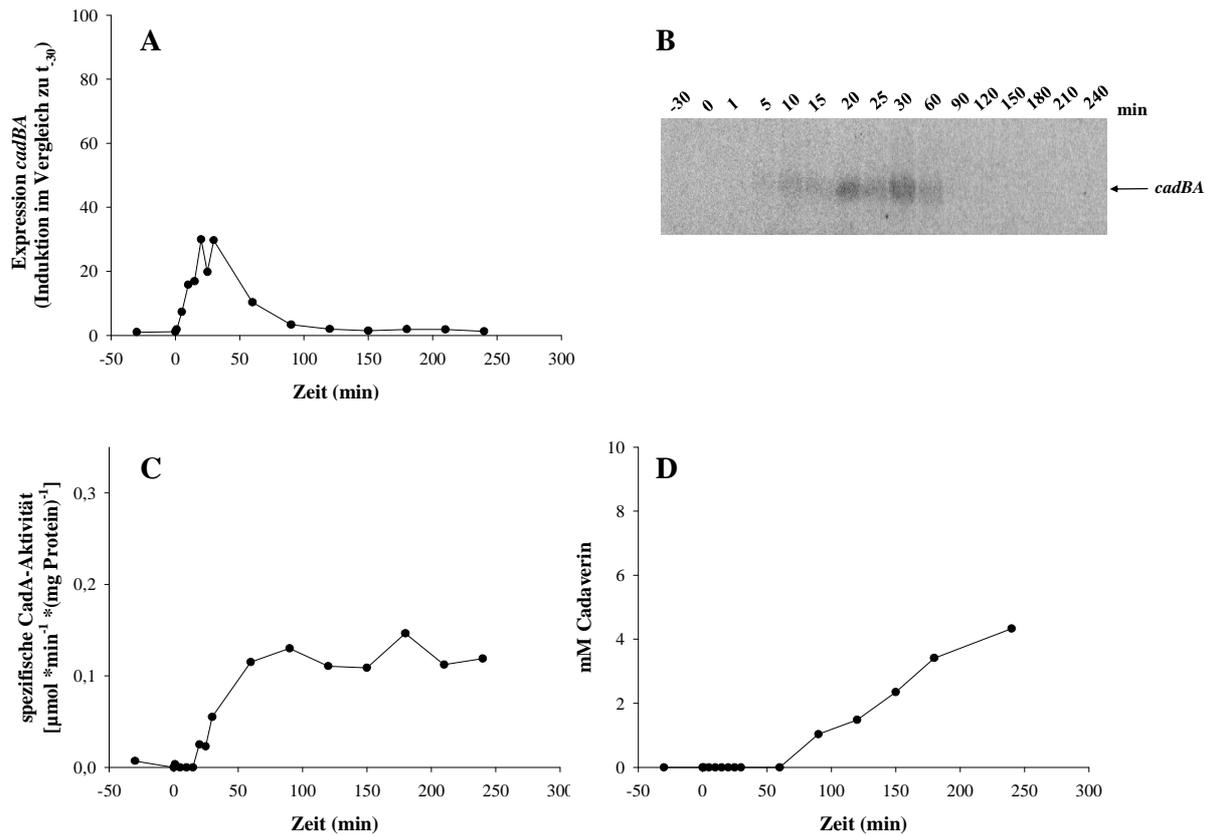


Abb. 9: Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in MG1655 Δ *ravA*

MG1655 Δ *ravA* wurde bis in die Mitte der logarithmischen Wachstumsphase aerob in KE-Medium (pH 7,6) kultiviert. Dann wurden die Zellen in KE-Medium (pH 5,8) mit 10 mM Lysin überführt und unter mikroaeroben Bedingungen weitere 4 h inkubiert. Zu den in der Abbildung gezeigten Zeitpunkten wurden jeweils Proben entnommen und die Aktivität des Cad-Systems anhand verschiedener Parameter analysiert.

A: Quantifizierung der *cadBA*-mRNA mit der Software ImageQuant (Version 5,0 Molecular Dynamics).

B: Autoradiogramm des Northern Blots, als Sonde wurde radioaktiv markierte *cadBA*-DNA verwendet.

C: Messung der spezifischen CadA-Aktivität in zellfreien Extrakten.

D: Messung von extrazellulärem Cadaverin nach Derivatisierung mit TNBS.

Cadaverin konnte erst nach 90 min im Kulturüberstand detektiert werden, nach 240 min wurden 4,33 mM gemessen (Abb. 9D), die extrazelluläre Cadaverin-Konzentration war somit um einen Faktor von $\sim 1,4$ geringer als die Cadaverin-Konzentration in *E. coli* MG1655 (vgl. Abb. 4D).

Die Analyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655 Δ ravA zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Transkription und Translation wie in *E. coli* MG1655, insgesamt war die Aktivität des Cad-Systems in *E. coli* MG1655 Δ ravA jedoch deutlich niedriger als im Wildtyp.

3.1.3.2 Versuche zur DNA-Bindung von RavA und ViaA

Da die oben beschriebenen Ergebnisse einen Einfluss von RavA und/oder ViaA auf die Transkription des *cadBA*-Operons zeigten, wurde als nächstes mittels Gel-Retardationsexperimenten untersucht, ob gereinigtes RavA bzw ViaA an die Promotorregion des *cadBA*-Operons bindet. Hierzu wurden beide Proteine jeweils mit dem radioaktiv markierten DNA-Fragment „Cad1-2“ inkubiert (2.5.9). Es wurde bereits gezeigt, dass CadC direkt an diese Region (bp -150 bis -59 des stromaufwärts des *cadBA*-Transkriptionsstarts gelegenen DNA-Bereichs) bindet (Küper und Jung, 2005). Anschließend wurde das DNA-Proteingemisch in einem 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel in einem Phosphorscreen entwickelt. Eine Proteinbindung an die DNA erkennt man an einer deutlichen Größenzunahme der DNA, welche somit wesentlich langsamer im Gel wandern würde, gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme der Menge an freier DNA.

Jedoch konnten weder RavA noch ViaA an „Cad1-2“ binden, wie an der gleichbleibenden DNA-Menge und am Fehlen eines Protein-DNA-Komplexes zu erkennen war (Abb. 10A bzw. 10B). Wurde „Cad1-2“ hingegen mit rekonstituiertem CadC inkubiert, so konnte sowohl die Abnahme der freien DNA durch die Bindung von CadC an „Cad1-2“ (vgl. Spur 1 aus Abb. 10B mit Abb. 10C) als auch ein hochmolekularer DNA-CadC-Komplex (Abb. 10C) detektiert werden. Somit ist ein Binden von RavA oder ViaA an die *cadBA*-Promotorregion, und eine damit verbundene direkte Transkriptionsaktivierung eher unwahrscheinlich.

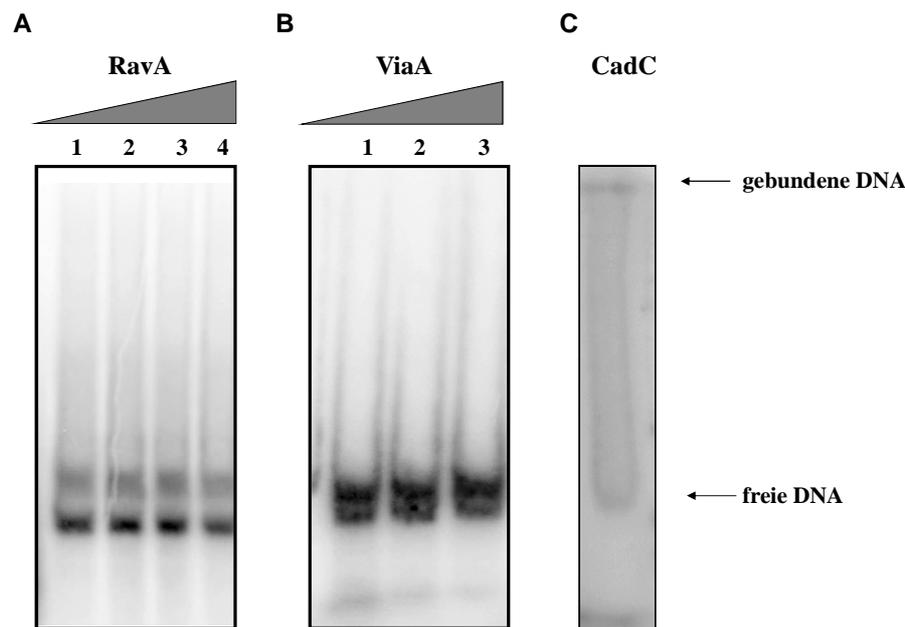


Abb. 10: Analyse der Bindung von RavA, ViaA und CadC an „Cad1-2“

Das radioaktiv markierte DNA-Fragment „Cad1-2“ (entspricht der Sequenz der *cadBA*-Promotorregion von bp -150 bis -59) wurde mit gereinigtem RavA, ViaA oder mit rekonstituiertem CadC in steigenden Konzentrationen inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 5% Polyacrylamidgel.

A: Zugabe von gereinigtem RavA zu „Cad1-2“; **Spur 1:** 0 μM RavA; **Spur 2:** 0,9 μM RavA; **Spur 3:** 1,82 μM RavA; **Spur 4:** 2,7 μM RavA

B: Zugabe von gereinigtem ViaA „Cad1-2“; **Spur 1:** 0 μM ViaA; **Spur 2:** 4,5 μM ViaA; **Spur 3:** 9 μM ViaA

C: Zugabe von 4,1 μM rekonstituiertem CadC zu „Cad1-2“

3.1.4 Mathematische Modellierung des Cad-Systems

Um komplexe Prozesse in einer Zelle besser zu verstehen, ist die mathematische Modellierung von großem Nutzen. Um das Cad-System in *E. coli* MG1655 quantitativ zu charakterisieren, wurden die unter 3.1.1 für den Wildtyp experimentell erhaltenen Ergebnisse, sowie bereits aus der Literatur bekannte Daten des Cad-Systems verwendet und in ein mathematisches Modell integriert. Um die Dynamik des Cad-Systems in den Mutanten *E. coli* MG1655-*lysP211* und *E. coli* MG1655 Δ *ravA* quantitativ zu beschreiben, wurde das mathematische Modell gemäß der jeweiligen Mutation modifiziert und die somit erhaltenen *in silico* Daten mit den *in vivo* bestimmten Daten (3.1.2.3 und 3.1.3.1) verglichen. Die Gleichungen des mathematischen Modells wurden von Georg Fritz und Prof. Dr. Ulrich Gerland am Institut für Theoretische Physik der Universität zu Köln berechnet.

3.1.4.1 Entwicklung eines mathematischen Modells des Cad-Systems von *E. coli* MG1655

Die quantitative Beschreibung der Daten für *E. coli* MG1655 (Wildtyp) umfasste die Integration der Reize pH-Wert, Lysin und Cadaverin durch CadC, die Dynamik der Genexpression und die Umsetzung von Lysin zu Cadaverin. Anhand dieser Daten wurde ein mathematisches Modell entwickelt, das mit Hilfe der nachfolgenden Gleichungen beschrieben werden kann.

Integration der Signale durch CadC:

Die mathematische Beziehung zwischen aktivem CadC (C^*) und den externen Reizen pH-Wert, Lysin und Cadaverin kann durch die sog. Rezeptor-Aktivitäts-Funktion beschrieben werden. Diese beruht auf der Annahme, dass die Rezeptor-Dynamik in Bezug auf die Genexpression schnell und deshalb C^* zu jeder Zeit im Gleichgewicht mit den Eingangsreizen ist. Außerdem wurde angenommen, dass die drei Reize unabhängig voneinander wahrgenommen werden und somit multiplikativ in die Funktion eingehen.

Für die Integration der Signale durch CadC *in silico* ergab sich somit folgende Funktion:

$$C^* = \tilde{C}_{\text{tot}} \cdot f(\text{pH}) \cdot g([L]) \cdot h([c]) \quad (1)$$

\tilde{C}_{tot} entspricht der Gesamtmenge an konstitutiv vorhandenem CadC, f , g und h sind Funktionen, die die Aktivität von CadC regulieren und abhängig vom pH-Wert (f), der Lysin-Konzentration (g) und der Cadaverin-Konzentration (c) sind.

Dynamik der Genexpression:

Die Abhängigkeit der Transkriptionsaktivität des Promotors P_{Cad} von aktivem CadC (C^*) kann mit Hilfe von thermodynamischen Modellen (Bintu *et al.*, 2005a,b) beschrieben werden, so dass sich für den zeitlichen Verlauf der *cadBA*-mRNA-Konzentration $[m]$ folgende Gleichung ergibt:

$$\frac{d}{dt} [m] = v_m \left[\frac{1 + (C^*/K_{C^*})^2 f}{1 + (C^*/K_{C^*})^2} \right]^2 - \lambda_m [m] \quad (2)$$

Hierbei ist v_m die basale Transkriptionsrate, λ_m die Degradationsrate der mRNA, f ist die maximale Induktion der Transkription im Vergleich zur basalen Transkription und K_{C^*} der Schwellenwert für die Bindung von C^* an die DNA.

Die Dynamik der *cadA*-Expression besteht aus einem Zusammenspiel von CadA-Synthese und CadA-Abbau und wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\frac{d}{dt} [A] = v_p [m] - \lambda_p [A] \quad (3)$$

$[A]$ ist die CadA-Konzentration in der Zelle, v_p ist die Translationsrate und λ_p ist die Degradationsrate von CadA.

Umsetzung von Lysin durch CadA und CadB:

Es wurde zum einen angenommen, dass CadA und CadB in gleichen Mengen vorliegen, da *cadA* und *cadB* polycistronisch abgelesen werden, zum anderen wurde die Summe von externem Lysin $[l]$ und Cadaverin $[c]$ als konserviert vorausgesetzt, d. h. $[l] + [c] = l_{tot}$. Außerdem ist die *in vitro* Aufnahme von Lysin durch CadB niedriger als die *in vitro* Decarboxylierung von Cadaverin, deshalb ist die Lysin-Aufnahme durch CadB wahrscheinlich der limitierende Reaktionsschritt.

Die Umsetzung von Lysin zu Cadaverin kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{d}{dt} [c] = v_{max} \frac{[A] (l_{tot} - [c])}{K_m + (l_{tot} - [c])} \quad (4)$$

v_{max} ist die Lysin-Turnover-Rate und K_m die Michaelis-Konstante für die Lysin-Umsetzung.

3.1.4.2 Entwicklung eines Modells für *E. coli* MG1655-*lysP211* und *E. coli* MG1655 Δ *ravA*

Mit Hilfe des für *E. coli* MG1655 (Wildtyp) entwickelten Modells sollte in einem nächsten Schritt die Dynamik des Cad-Systems in *E. coli* MG1655-*lysP211* und in *E. coli* MG1655 Δ *ravA* berechnet und mit den *in vivo* erhaltenen Daten verglichen werden.

In der Mutante MG1655-*lysP211* ist die Sensitivität des Cad-Systems bezüglich Lysin nicht mehr vorhanden (Abb. 6,7). Um diese Mutante mathematisch zu beschreiben wurde deshalb in der Rezeptor-Aktivitäts-Funktion (1) der Lysin-abhängige Teil auf einen konstanten Wert gesetzt, d.h. $g([I]) = const$. Das Modell wurde anschließend mit den gleichen Parametern wie das Wildtyp-Modell integriert. Es beschrieb den schnelleren Beginn der *cadBA*-Expression und die erhöhte Transkriptionsrate im Vergleich zum Wildtyp, da durch das Fehlen von LysP bereits zum Zeitpunkt der Induktion eine maximale Menge an aktivem CadC vorhanden war (Abb. 11A). Dies resultiert in einer höheren relativen CadA-Menge (Abb. 11B) und einer höheren extrazellulären Cadaverin-Konzentration (Abb. 11C).

Wenig bekannt ist bis jetzt über die Interaktion zwischen RavA bzw. ViaA und dem Cad-System. Deshalb wurden in dem Modell für MG1655 Δ *ravA* mehrere Mechanismen zur Erklärung der reduzierten *cadBA*-Expression in Erwägung gezogen:

- a) RavA oder ViaA aktivieren direkt die *cadBA*-Expression: das Fehlen von RavA/ViaA würde das erniedrigte *cadBA*-Transkriptionsniveau erklären.
- b) RavA oder ViaA aktivieren CadC: durch das Fehlen von RavA/ViaA würde der Gleichgewichtswert von CadC erniedrigt werden, dadurch könnte CadC den *cadBA*-Promotor nicht mehr vollständig aktivieren.
- c) RavA oder ViaA stabilisieren die *cadBA*-mRNA: dies würde in MG1655 Δ *ravA* zu einer erhöhten Degradationsrate und damit zu einem erniedrigten *cadBA*-Niveau führen.

Es stellte sich heraus, dass die Hypothesen a) und b) am besten mit den experimentellen Daten übereinstimmen. Einen Einfluss auf die Degradationsrate gemäß c) konnte ausgeschlossen werden, da dies in einer wesentlich schnelleren Dynamik der mRNA resultieren würde.

In Abb. 11 ist exemplarisch die Vorhersage des Modells gemäß Hypothese a) gezeigt: es beschrieb die erniedrigte *cadBA*-Expression im Vergleich zum Wildtyp, so wie sie auch *in*

in vivo gemessen wurde (Abb. 11A). Dies resultierte in einer erniedrigten relativen Menge an CadA (Abb. 11B) und einer geringeren Cadaverin-Konzentration (Abb. 11C). Für RavA/ViaA kann also eine Rolle bei der Aktivierung der *cadBA*-Transkription angenommen werden, wobei die Ergebnisse der unter 3.1.3.2 durchgeführten DNA-Bindeexperimente eher einen indirekten Effekt auf die *cadBA*-Transkription indizierten.

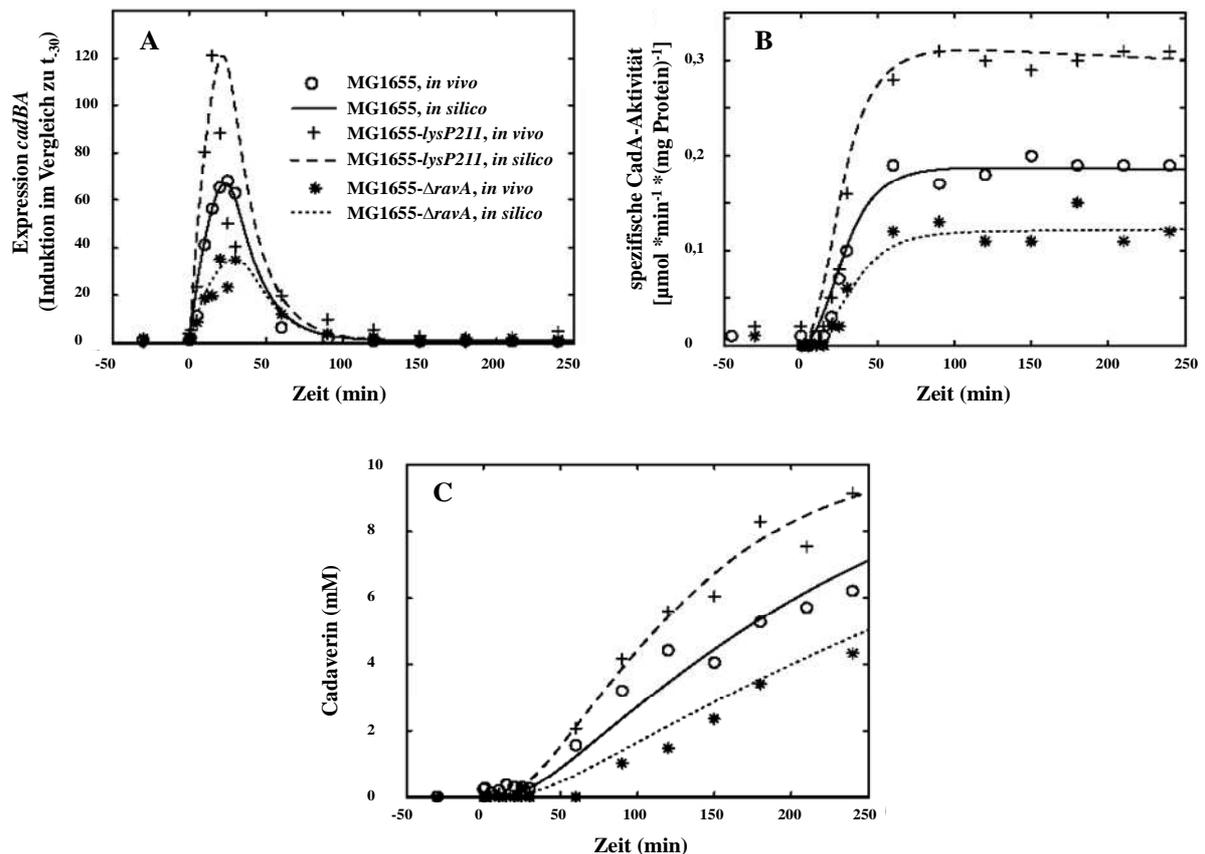


Abb. 11: Induktion des Cad-Systems: Vergleich der *in silico* Daten mit den *in vivo* Daten

Die *E. coli*-Stämme MG1655, MG1655-lysP211 bzw. MG1655ΔravA wurden zunächst bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase aerob in Minimalmedium (pH 7,6) kultiviert (t_{30}). Das Cad-System wurde durch Überführen der Kulturen in Minimalmedium (pH 5,8) + 10 mM Lysin induziert (t_0). Die weitere Kultivierung erfolgte mikroaerob. Zu den in der Abbildung gezeigten Zeitpunkten wurden jeweils Proben entnommen und die Aktivität des Cad-Systems anhand der *cadBA*-Expression (A), der spezifischen CadA-Aktivität in zellfreien Extrakten (B) und der Messung von extrazellulärem Cadaverin (C) analysiert.

Insgesamt ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den *in silico* berechneten Daten und den *in vivo* gemessenen Daten, es konnten der zeitliche Verlauf der *cadBA*-Transkription, der relativen CadA-Menge und des gebildeten Cadaverins sowohl in MG1655-lysP211 als auch in MG1655ΔravA gut berechnet werden. Somit lässt sich die mathematische Modellierung sehr gut anwenden, um die Dynamik des Cad-Systems in verschiedenen Deletionsmutanten zu simulieren.

3.2 Reizwahrnehmung durch CadC

CadC besteht aus 3 Domänen, einer N-terminalen, cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer C-terminalen, periplasmatischen Domäne. Dell *et al.* konnten 1994 zeigen, dass zufällige Aminosäureaustausche in der C-terminalen Domäne zu einer veränderten Reizwahrnehmung bezüglich Lysin, niedriger pH-Wert und Cadaverin führten. Aufgrund dieser Ergebnisse und aufgrund der Exposition der C-terminalen Domäne in das Periplasma wurde diese als Signaleingangsdomäne bezeichnet, jedoch wurde diese Annahme bisher nicht durch weitere Experimente bestätigt. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit mittels *in vitro* Experimenten die Affinität von CadC für Lysin und Cadaverin analysiert werden, außerdem sollte die Abhängigkeit der *cadBA*-Expression von Lysin und Cadaverin detailliert *in vivo* untersucht werden.

3.2.1 Affinität von CadC für Lysin

Zunächst wurde mit Hilfe von Tryptophanfluoreszenz-Messungen die Affinität der periplasmatischen Domäne von CadC *in vitro* analysiert. Proteine zeigen intrinsische Fluoreszenz, bedingt durch die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und v. a. Tryptophan. Konformationsänderungen in Proteinen, wie sie auch bei der Bindung eines Liganden entstehen, können die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins beeinflussen. Da das im Ansatz vorhandene Detergenz bei Vorversuchen mit solubilisiertem CadC einen störenden Einfluss auf die Messungen zeigte, wurde für diese Experimente die lösliche periplasmatische Domäne von CadC (CadC188-512) verwendet. Diese enthält vier Tryptophanreste, die über die gesamte periplasmatische Domäne verteilt vorliegen (W211, W318, W450, W488). Eine mögliche Bindung von Lysin könnte somit in einer Veränderung der Tryptophanfluoreszenz resultieren. Um eine direkte Bindung von Lysin an CadC nachzuweisen, wurde zusätzlich die Methode der isothermalen Titrationskalorimetrie angewandt, hierfür wurde solubiliertes CadC verwendet.

3.2.1.1 Produktion und Reinigung der periplasmatischen Domäne

Die periplasmatische Domäne von CadC wurde zunächst als Hybridprotein, bestehend aus CadC188-512 und Thioredoxin (Trx), im Cytosol von *E. coli* Origami™ B (DE3)pLysS (transformiert mit pET32a-*trx-cadC188-512*) produziert (2.3.9). Die Reinigung von Trx-CadC188-512 wurde mittels Affinitätschromatographie wie unter 2.5.2.1 beschrieben durchgeführt. Aus 50 mL Cytosol wurden ca. 10 mg Trx-CadC188-512 erhalten, die Reinheit des eluierten Proteins betrug ~ 95% (Abb. 12A).

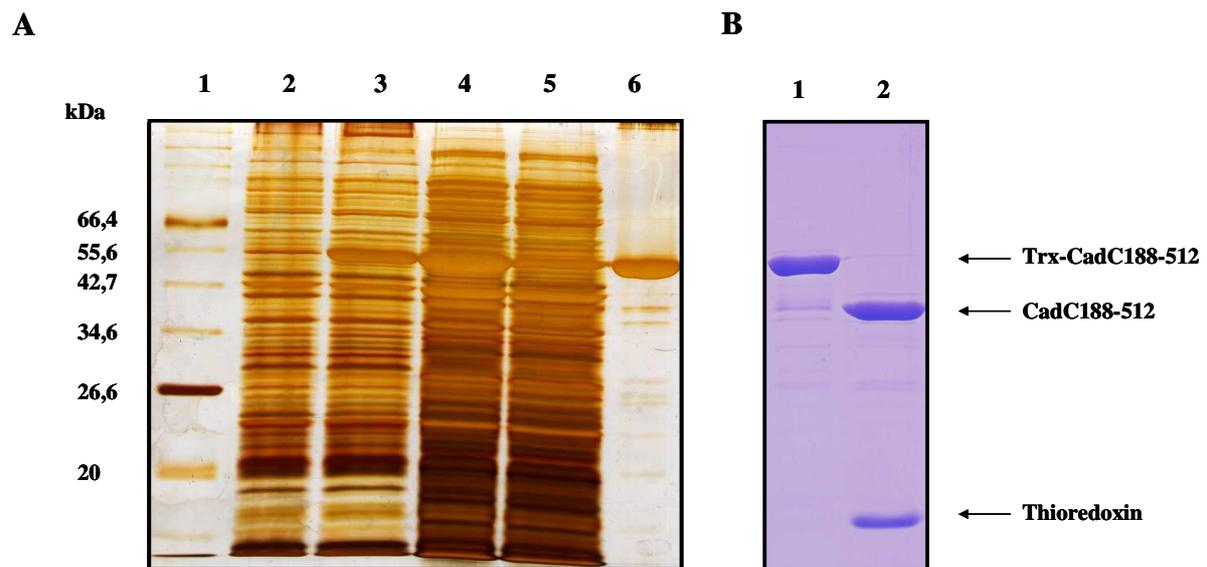


Abb. 12: Reinigung von Trx-CadC188-512 und Abspaltung von Thioredoxin

A: Reinigung von Trx-CadC188-512 über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12,5% SDS-Gel nach Lämmli (1970), die Sichtbarmachung durch Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987).

Spur 1: Standard; **Spur 2:** Extrakt aus ganzen Zellen, vor Induktion mit 0,1 mM IPTG (10 μg); **Spur 3:** Extrakt aus ganzen Zellen, 3 h nach Induktion mit 0,1 mM IPTG (10 μg); **Spur 4:** Cytosol (5 μL); **Spur 5:** nicht an Ni^{2+} -NTA-gebundene Proteine (5 μL); **Spur 6:** Eluat (5 μg).

B: Abspaltung von Thioredoxin durch biotinyliertes Thrombin. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12,5% SDS-Gel nach Lämmli (1970), die Sichtbarmachung durch Coomassie-Färbung nach Weber und Osborn (1969).

Spur 1: Trx-CadC188-512, vor Thrombin-Zugabe (5 μg); **Spur 2:** CadC188 (5 μg), nach Verdau mit Thrombin

Um das Thioredoxin von der periplasmatischen Domäne von CadC abzuspalten, wurde ein proteolytischer Verdau mit Thrombin durchgeführt. Hierfür wurde pro 1 mg Trx-CadC188-512 1 Unit biotinyliertes Thrombin eingesetzt. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/mL. Der proteolytische Verdau erfolgte für 4 h bei 20°C, Thrombin wurde dann aus dem Ansatz mittels Streptavidin-Agarose nach Angaben des Herstellers entfernt (2.5.2.2). Zur Überprüfung der Thioredoxin-Abspaltung wurden die proteolytisch gespaltenen Proteine in einem 12,5%-SDS-Gel (Lämmli, 1970) aufgetrennt. Das 54,8 kDa große Fusionsprotein wurde in zwei Fragmente gespalten, welche CadC188-512 (40,7 kDa) und Thioredoxin (14,1 kDa) entsprachen. Die Abspaltung von Thioredoxin erfolgte zu ~ 100% (Abb. 12B). Das abgespaltene Thioredoxin konnte mit Hilfe von Ultrafiltration zum Teil aus dem Ansatz entfernt werden, verbleibende geringfügige Mengen an Thioredoxin hatten keinen Einfluss auf die Tryptophanfluoreszenz-Messungen und wurden deshalb ignoriert.

3.2.1.2 Analyse der Lysin-Affinität von CadC188-512 mittels Tryptophanfluoreszenz

Die Messungen der Tryptophanfluoreszenz erfolgten wie unter 2.5.10 beschrieben. Als Puffer wurde 150 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7) und 150 mM NaCl verwendet, CadC188-512 wurde vor der Messung gegen diesen Puffer dialysiert. Die Durchführung der Versuche erfolgte bei 25°C. Es wurden Spektren im Bereich von 300 bis 500 nm aufgenommen, die Anregung wurde bei 287 nm durchgeführt, die maximale Fluoreszenzemission war bei 337 nm. Die schrittweise Zugabe von Lysin führte zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität von ca. 13% bei 1 mM Lysin (Abb. 13A). Wurden die Veränderungen in der Fluoreszenzintensität als $\Delta F/F$ angegeben (ΔF ist die Veränderung in der maximalen Fluoreszenzintensität nach Zugabe des Liganden, F ist die maximale Fluoreszenz ohne Zugabe von Ligand), so wurde ein maximaler $\Delta F/F$ -Wert von 0,134 ($\pm 0,01$) nach Zugabe von 1 mM Lysin erhalten (Abb. 13B).

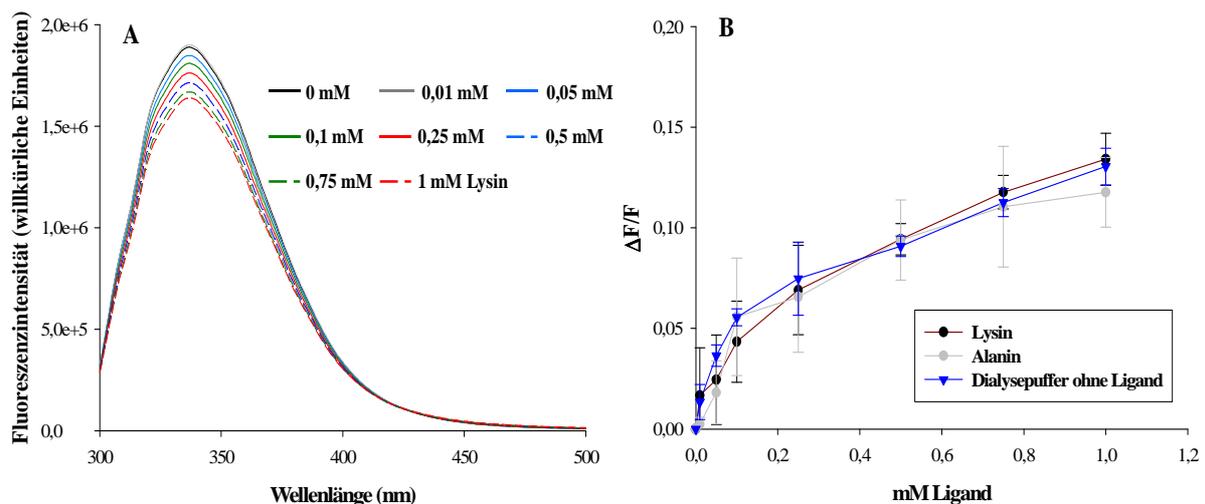


Abb. 13: Einfluss von Lysin, Alanin und Dialysepuffer auf die Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512

Zu 2,5 μ M CadC188-512 wurden steigende Konzentrationen an Lysin bzw. Alanin gegeben und das Emissionsspektrum zwischen 300 und 500 nm aufgenommen. Als weitere Kontrolle für unspezifische Veränderungen der Fluoreszenz aufgrund von Puffereffekten wurde Dialysepuffer ohne Ligand zu CadC188-512 titriert.

A: Fluoreszenzspektrum von CadC188-512 nach Zugabe von 0 bis 1 mM Lysin; das dargestellte Spektrum ist ein Mittelwert aus 3 Spektren.

B: Veränderungen in der Fluoreszenz von CadC188-512 nach Zugabe von Lysin, Alanin und Dialysepuffer ohne Ligand, die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens 3 Messungen.

Um unspezifische Effekte zu detektieren, wurde als Negativkontrolle Alanin, eine Aminosäure, die keine Induktion des Cad-Systems bewirkt, verwendet. Die Titration von Alanin zu CadC188-512 führte bereits zu Veränderungen in der Fluoreszenz des Proteins, die

als unspezifische Effekte aufgrund der Verdünnung angenommen wurden. Der $\Delta F/F$ -Wert betrug $0,120 (\pm 0,02)$. Ein ähnliches Ergebnis war bei der Titration von Dialysepuffer ohne Ligand zu verzeichnen (Abb. 13B). Wurde $\Delta F/F_{\text{Lysin}}$ mit dem Verdünnungsfaktor $\Delta F/F_{\text{Alanin}}$ korrigiert, so ergab sich kein Effekt auf die Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512 nach Zugabe von 1 mM Lysin.

Da möglicherweise die maximale Lysin-Konzentration im Versuchsansatz mit 1 mM zu gering war, wurde diese in nachfolgenden Versuchen erhöht. Der Versuch wurde bei pH 7 durchgeführt, die maximale Konzentration an Lysin betrug am Ende des Experiments 10 mM. Es konnte zwar bei steigender Lysin-Konzentration auch ein steigender $\Delta F/F$ -Wert bestimmt werden, bei 10 mM betrug dieser nach Korrektur durch die Verdünnungseffekte $0,048 (\pm 0,004)$, jedoch ergab die berechnete Regression keine typische Sättigungskurve, die auf eine spezifische Bindung des Liganden hinweisen würde (Abb. 14A). Für die Bestimmung des K_D -Wertes wurden die Daten in Form eines Scatchard-Plots dargestellt (Scatchard, 1949). Hierbei sind auf der Ordinate $(\Delta F/F)/[L]$ aufgetragen, auf der Abszisse $\Delta F/F$. Anhand der Steigung der Regressionsgeraden lässt sich die Assoziationskonstante K_A bestimmen, die Dissoziationskonstante K_D ist dann $-1/K_A$. Der K_D -Wert ist ein Maß für die Affinität des Proteins zum Ligand und betrug für die Bindung von Lysin 2,29 mM (Abb. 14B).

Zusätzlich wurde das Experiment noch bei pH 5,8 durchgeführt, da CadC bei einem niedrigen pH-Wert möglicherweise eine andere Konformation aufweist, die vielleicht wichtig sein könnte für eine Bindung von Lysin. Hier waren die $\Delta F/F$ -Werte nach Korrektur mit dem Verdünnungsfaktor jedoch noch niedriger [$\Delta F/F$ bei 10 mM Lysin: $0,031 (\pm 0,002)$], und die Form der berechneten Regressionsgeraden deutete ebenfalls nicht auf eine spezifische Bindung von Lysin hin (Abb. 14A). Die Darstellung der Daten nach Scatchard ergab annähernd eine Gerade, so dass kein K_D -Wert ermittelt werden konnte (Abb. 14B).

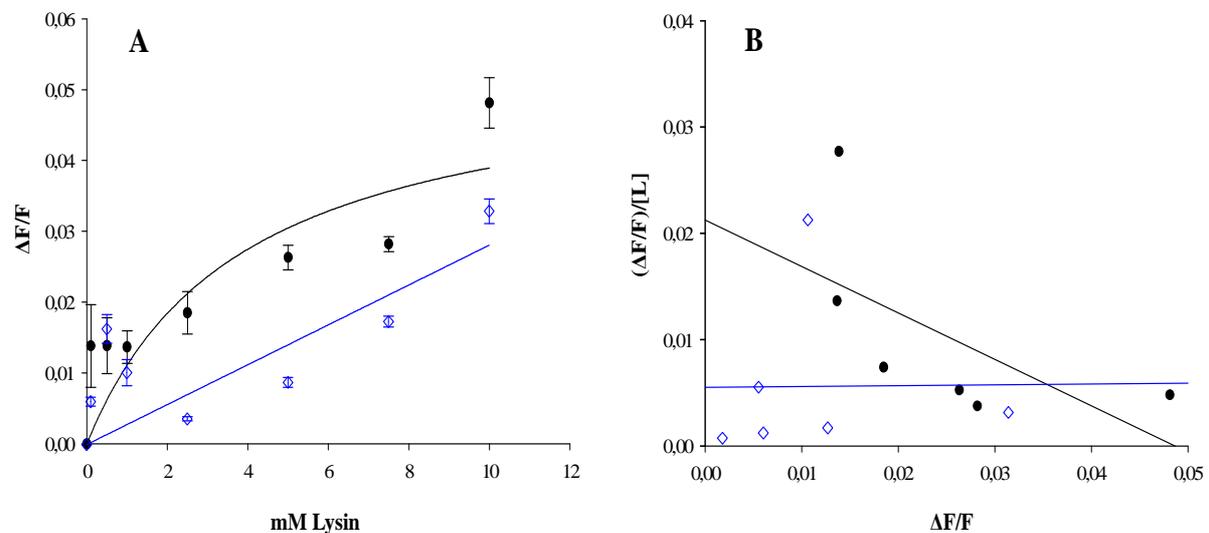


Abb. 14: Veränderung der Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512 nach Zugabe von Lysin

Die Messungen wurden in 150 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,0 bzw. pH 5,8) und 150 mM NaCl bei 25°C durchgeführt. Zu 2,5 μ M CadC188-512 wurden steigende Konzentrationen an Lysin titriert. Verdünnungseffekte sind bereits abgezogen. Die Berechnung der Regression wurde mit der Software SigmaPlot (Version 9.0; Systat Software) durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens 3 Messungen.

A: Veränderungen in der Fluoreszenz durch Zugabe von Lysin bei pH 7,0 (●) bzw. pH 5,8 (◇), dargestellt als $\Delta F/F$, wobei ΔF die Veränderung in der maximalen Fluoreszenzintensität (337 nm) nach Zugabe von Lysin in der jeweiligen Konzentration ist, F ist die maximale Fluoreszenz ohne Lysin-Zugabe.

B: Darstellung der Fluoreszenzveränderung nach Scatchard (1949) bei pH 7,0 (●) bzw. pH 5,8 (◇).

Auch die Erhöhung der Endkonzentration auf 30 mM Lysin im Ansatz führte zu keiner Sättigungskurve, welche eine spezifische Lysin-Bindung indizieren würde (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnte mit den Messungen der Tryptophanfluoreszenz nur eine sehr geringe Affinität der periplasmatischen Domäne von CadC für Lysin nachgewiesen werden.

3.2.1.3 Bestimmung der Affinität von CadC188-512-R265C für Lysin

Unter den von Dell *et al.* (1994) isolierten CadC-Mutanten war ein Basenaustausch, der eine Substitution von Arginin durch Cystein an Position 265 (R265C) bewirkte. Dieser Austausch führte zu einer Lysin-unabhängigen *cadBA*-Expression. Eine Erklärung hierfür wäre, dass dieser Austausch die Konformation von CadC so veränderte, dass eine erhöhte Affinität für Lysin entstand. Unter diesen Umständen wären Lysin-Konzentrationen im μ M-Bereich ausreichend, um die *cadBA*-Expression zu induzieren (Neely *et al.*, 1994).

Um den Aminosäureaustausch R265C zu konstruieren wurde wie unter 2.4.9 beschrieben vorgegangen. Die Überproduktion, Reinigung und Abspaltung von Thioredoxin wurde analog

zu CadC188-512 (3.2.1.1) durchgeführt. Dabei entstand das Konstrukt CadC188-512-R265C. Wie bei CadC188-512 wurde die Veränderung der Tryptophanfluoreszenz nach Zugabe von Lysin analysiert.

Die Titration von steigenden Lysin-Konzentrationen zu CadC188-512-R265C resultierte in einer nur geringfügigen Veränderung der Tryptophanfluoreszenz, der maximale $\Delta F/F$ -Wert betrug, nach Korrektur mit dem Verdünnungsfaktor, bei 10 mM Lysin $0,053 (\pm 0,004)$. Die Berechnung der Regression ergab eine Art Sättigungskurve, was eine mögliche Affinität von CadC188-512-R265C für Lysin indizierte (Abb. 15A). Die Auftragung der Daten nach Scatchard (1949) ergab einen K_D -Wert von 3,41 mM (Abb. 15B).

Somit wies auch CadC188-512-R265C nur eine relativ geringe Affinität für Lysin auf.

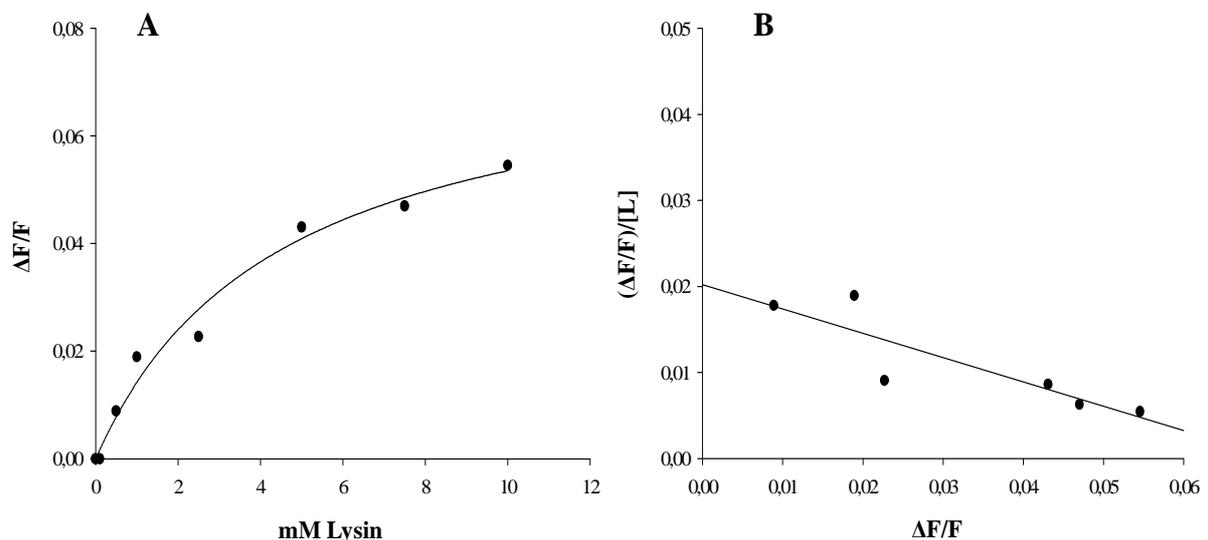


Abb. 15: Einfluss von Lysin auf die Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512-R265C

Der Versuch wurde in 150 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7) und 150 mM NaCl bei 25°C durchgeführt. Zu 2,5 μ M CadC188-512-R265C wurden steigende Konzentrationen an Lysin titriert. Verdünnungseffekte sind bereits abgezogen. Die Berechnung der Regression wurde mit der Software SigmaPlot (Version 9.0; Systat Software) durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens 3 Messungen.

A: Veränderungen in der Fluoreszenz durch Zugabe von Lysin, dargestellt als $\Delta F/F$, wobei ΔF die Veränderung in der maximalen Fluoreszenzintensität (337 nm) nach Zugabe von Lysin in der jeweiligen Konzentration ist, F ist die maximale Fluoreszenz ohne Liganden-Zugabe.

B: Darstellung der Fluoreszenzveränderung nach Scatchard (1949).

3.2.1.4 Direkte Bestimmung der Lysin-Affinität von CadC mittels ITC

Die mit Hilfe der Tryptophanfluoreszenz erhaltenen Ergebnisse konnten nur eine sehr geringe Affinität der periplasmatischen Domäne von CadC für Lysin nachweisen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass möglicherweise keine korrekte Faltung der periplasmatischen Domäne

vorlag, oder aber dass das Vorhandensein der Transmembrandomäne und/oder der cytoplasmatischen Domäne für die Lysin-Wahrnehmung nötig waren. Daher wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen das vollständige Protein eingesetzt wurde.

Messungen der Tryptophanfluoreszenz sind nur eine indirekte Methode, um Konformationsveränderungen in einem Protein zu erkennen, die Bindung eines Liganden muss nicht unbedingt eine Auswirkung auf die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins haben. Deshalb wurde die Methode der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC) gewählt. Mit Hilfe der ITC kann direkt eine Bindung von Liganden gemessen werden. Hierbei wird zu einer Proteinlösung, die in einer Probenzelle vorliegt, schrittweise der Ligand aus einem Injektor injiziert. Kommt es zu einer Bindung, zeigt sich dies durch die Entstehung oder den Verbrauch von Wärmeenergie, die abnimmt je mehr Ligand an das Protein gebunden hat, bis letztendlich eine Sättigung eintritt.

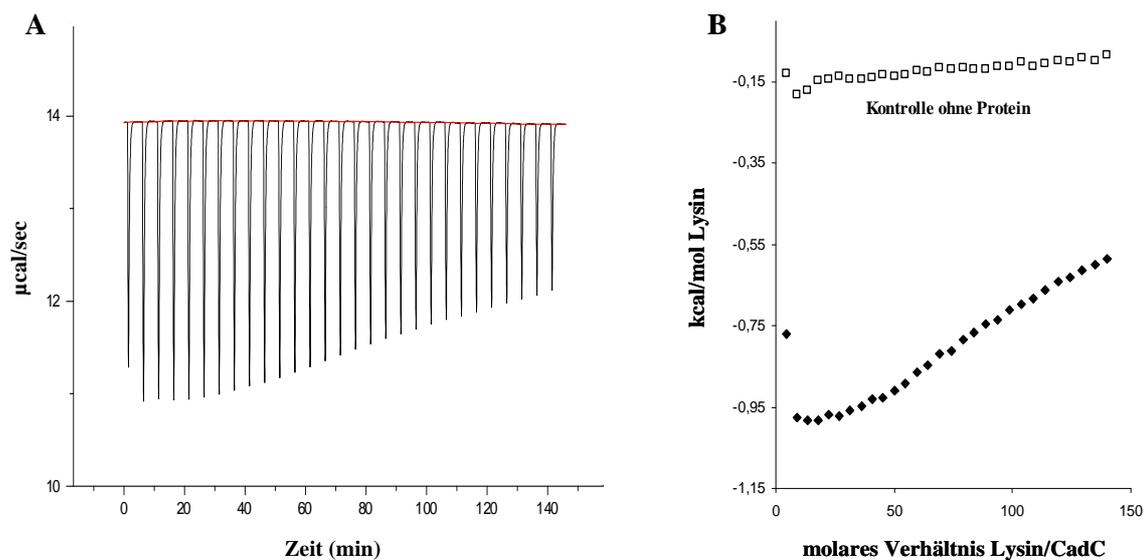


Abb. 16: Bestimmung der Affinität von CadC für Lysin mittels ITC

A: Verlauf der Titration von je 10 μL Lysin (aus einer 10 mM Stammlösung) zu 16 μM solubilisiertem CadC; der Versuchspuffer bestand aus 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 5,8), 10% (v/v) Glycerol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 600 mM NaCl und 0,2% (v/v) LDAO; Lysin war im gleichen Puffer gelöst

B: Plot nach Abzug der Referenz und Integration der Daten

Für die Messungen wurde CadC produziert und gereinigt wie bereits bei Küper (2001) beschrieben. Während der Titration von Lysin zu CadC wurden exotherme Signale detektiert, welche mit der Zeit immer geringer wurden (Abb. 16A). Dies könnte auf eine Affinität des Proteins für Lysin hinweisen, deshalb wurden die hier erhaltenen Daten integriert und als Plot

dargestellt (Abb. 16B). Zum Vergleich ist in der Graphik ein Kontrollversuch abgebildet, der unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, jedoch in der Probenzelle kein Protein enthielt. Dadurch wurde die Wärme, die aufgrund der Verdünnung des Liganden in der Probenzelle entstand, gemessen. Nach Abzug dieses Effekts und Integration der Daten wurde eine Kurve erhalten, die jedoch keinen sigmoiden Verlauf zeigte, welcher typisch für eine Liganden-Bindung wäre. Für eine exakte Berechnung der Bindungsparameter wäre dieser sigmoide Verlauf jedoch notwendig, dennoch wurde die Assoziationskonstante K_A berechnet, welche als $44,48 \text{ M}^{-1}$ angegeben wurde. Da $K_D = 1/K_A$ ist, betrug der K_D ca. 22,5 mM, was auf eine sehr niedrige Affinität hinwies.

Wie jedoch bereits erwähnt, lassen sich genaue Werte nur aus einer sigmoiden Kurve bestimmen. Dazu muss mehr Protein eingesetzt werden, denn je geringer die Affinität zum Ligand ist, desto mehr Protein muss bei einer ITC-Messung eingesetzt werden, um zuverlässige Werte zu erhalten. Es gelang jedoch nicht, CadC in höheren Konzentrationen zu produzieren. Weitere Experimente mit in *E. coli* Phospholipiden rekonstituiertem CadC (bei pH 5,8 und pH 7,6), bzw. mit in Membranvesikeln von *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*cadC* überproduziertem CadC ergaben keine auswertbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Somit konnten sowohl die Tryptophanfluoreszenz-Messungen als auch die ITC-Messungen nur eine sehr geringe Affinität von CadC für Lysin *in vitro* zeigen.

3.2.2 Einfluss der externen Lysin-Konzentration auf das Cad-System *in vivo*

Da CadC *in vitro* nur eine extrem niedrige Affinität für Lysin aufwies, wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss von steigenden externen Lysin-Konzentrationen auf die *cadBA*-Expression *in vivo* untersucht. Die Zellen wurden hierfür in Minimalmedium bei pH 5,8 unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und als Maß für die *cadBA*-Expression die spezifische CadA-Aktivität in zellfreien Extrakten wie unter 2.5.13 beschrieben bestimmt.

3.2.2.1 Abhängigkeit der *cadBA*-Expression von der externen Lysin-Konzentration

In der *lysP*-Mutante *E. coli* MG1655-*lysP211* war die *cadBA*-Expression im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht (vgl. Abb. 4 und 7). In den folgenden Versuchen sollte überprüft werden, ob die *cadBA*-Expression in Wildtyp *E. coli* MG1655 (also bei Anwesenheit von LysP) unter Bedingungen eines niedrigen pH-Wertes durch steigende Lysin-Konzentrationen ebenfalls erhöht wird. Der Lysin-Schwellenwert für die *cadBA*-Expression liegt zwischen 5 und 10 mM Lysin (Neely *et al.*, 1994; eigene nicht gezeigte Daten), deshalb wurden in der

vorliegenden Arbeit externe Lysin-Konzentrationen ab 10 mM eingesetzt. Als Maß für die Expression von *cadBA* wurde die spezifische CadA-Aktivität bestimmt.

Ohne Lysin war wie erwartet keine *cadBA*-Expression zu verzeichnen. Bei Vorhandensein von 10 mM Lysin war das System bereits voll induziert, es wurde eine spezifische CadA-Aktivität = $0,55 (\pm 0,13) \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$ gemessen (Abb. 17). Dieser Wert war höher als die Werte, die bei der zeitabhängigen Analyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655 gemessen wurden (vgl. Abb. 4C), dies lag jedoch an den Kultivierungsbedingungen der Zellen, da bei der Kultivierung in Gegenwart unterschiedlicher Lysin-Konzentrationen bereits eine längere Adaptation der Zellen an die induzierenden Bedingungen stattgefunden hatte. Höhere Lysin-Konzentrationen (bis zu 250 mM) hatten jedoch keine verstärkte *cadBA*-Expression zur Folge, die spezifische CadA-Aktivität war ähnlich wie die Aktivität in Gegenwart von 10 mM Lysin [zwischen $0,49 (\pm 0,08)$ und $0,54 (\pm 0,17) \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$; Abb. 17].

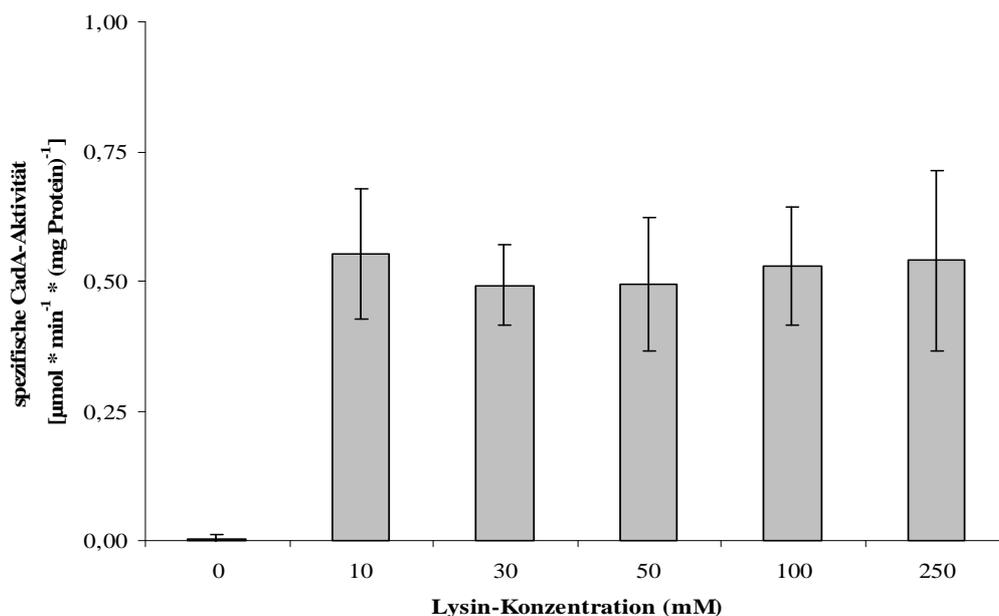


Abb. 17: Abhängigkeit der *cadBA*-Expression von der externen Lysin-Konzentration

E. coli MG1655 (Wildtyp) wurde in Minimalmedium (pH 5,8) mikroaerob in Gegenwart steigender Lysin-Konzentrationen kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und die spezifische CadA-Aktivität als Maß für die Expression von *cadBA* bestimmt.

Die *cadBA*-Expression wurde somit unabhängig von der extrazellulären Lysin-Konzentration aktiviert, sobald ein bestimmter Schwellenwert an externem Lysin vorhanden war.

3.2.2.2 Abhängigkeit der *cadBA*-Expression von der externen Lysin-Konzentration bei Überproduktion von LysP

In einem weiteren Versuch wurde die *lysP*-Kopienzahl in der Zelle durch die Transformation des *lysP*-negativen Stammes *E. coli* MG1655-*lysP211* mit pT-*lysP* erhöht und als Maß für die *cadBA*-Expression die spezifische CadA-Aktivität in Abhängigkeit der Lysin-Konzentration analysiert. Als Kontrolle wurde die spezifische CadA-Aktivität im Wildtyp-Stamm *E. coli* MG1655 in Gegenwart von 10 mM Lysin bestimmt, welche $0,90 (\pm 0,13) \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$ betrug. Wie bereits unter 3.2.2.1 beschrieben, beruhte dieser relativ hohe Wert im Vergleich zu den unter 3.1.1 dargestellten Werten der zeitabhängigen Analyse des Cad-Systems auf einer längeren Adaptation der Zellen an die induzierenden Bedingungen.

Die Erhöhung der Kopienzahl von *lysP* resultierte in einer Reduktion der spezifischen CadA-Aktivität auf $0,11 (\pm 0,08) \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$, wenn 10 mM Lysin vorhanden waren. Dies entsprach einer Reduktion der Aktivität um 87,7 %. Das Vorhandensein von höheren Lysin-Konzentrationen führte jedoch, trotz der hohen *lysP*-Kopienzahl, zu einer gesteigerten *cadBA*-Expression. So wurde eine spezifische CadA-Aktivität von $0,40 (\pm 0,11) \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$ gemessen, wenn 100 mM Lysin vorhanden war (Abb. 18). Höhere Lysin-Konzentrationen konnten also den reprimierenden Effekt von LysP auf das Cad-System teilweise aufheben.

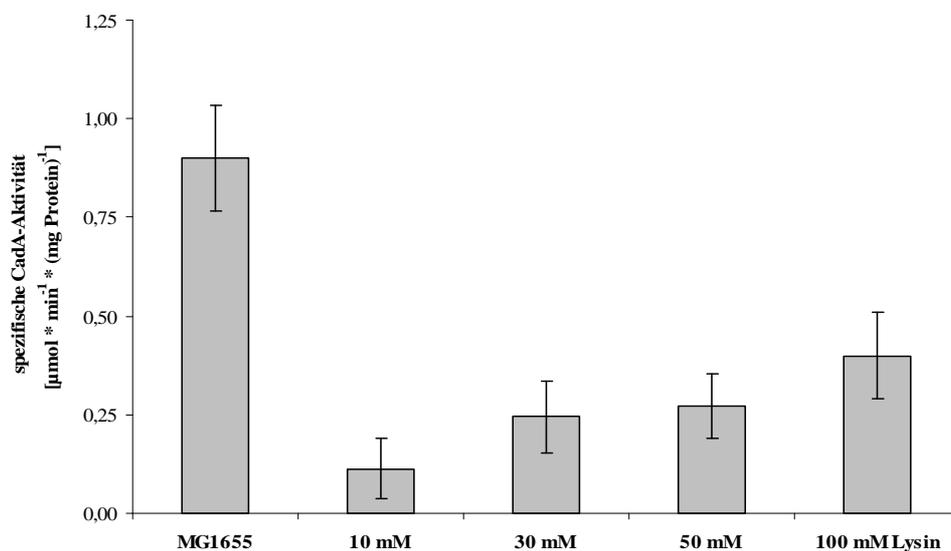


Abb. 18: Aufhebung des reprimierenden Effekts von LysP auf die *cadBA*-Expression durch Lysin

Der *lysP*-negative Stamm *E. coli* MG1655-*lysP211* wurde mit pT-*lysP* transformiert und in Minimalmedium (pH 5,8) mikroaerob in Gegenwart steigender externer Lysin-Konzentrationen kultiviert. Als Kontrolle ist der Wildtyp-Stamm *E. coli* MG1655 dargestellt, der in Gegenwart von 10 mM Lysin kultiviert wurde. Die Zellen wurden geerntet und die spezifische CadA-Aktivität als Maß für die Expression von *cadBA* bestimmt.

Die *in vivo* Experimente konnten somit zeigen, dass auch hohe Lysin-Konzentrationen die *cadBA*-Expression in *E. coli* MG1655 (Wildtyp) nicht verstärken konnten, was zusammen mit den unter 3.2.1 dargestellten *in vitro* Experimenten eine direkte Wahrnehmung von Lysin durch CadC unwahrscheinlich macht. Die Lysin-Konzentration scheint jedoch im Zusammenhang mit der *lysP*-Kopienzahl eine Rolle zu spielen.

3.2.3 Cadaverin als Signal für die periplasmatische Domäne von CadC

Während der Decarboxylierung von Lysin durch CadA entsteht Cadaverin, für das eine negative Rückkopplung auf das Cad-System *in vivo* gezeigt wurde (Neely *et al.*, 1994). Bereits 20 μM Cadaverin reduzierten die Expression einer *cadA-lacZ*-Fusion, durch die Zugabe von 1,3 mM Cadaverin wurde die Aktivität des Cad-Systems komplett gehemmt. Das Derivat mit der Aminosäuresubstitution R265C hingegen induzierte die Expression der *cadA-lacZ*-Fusion auch in Gegenwart von 1,3 mM Cadaverin (ca. 69% im Vergleich zu 0 mM Cadaverin; Neely *et al.*, 1994). Diese Ergebnisse indizierten, dass ein Abschalten der Aktivität des Cad-Systems durch die direkte Bindung von Cadaverin an CadC erfolgte, wobei die Aminosäuresubstitution R265C die Affinität für Cadaverin erniedrigte. In der vorliegenden Arbeit sollte diese Hypothese biochemisch untersucht werden. Hierfür wurde die Veränderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512 und CadC188-512-R265C nach Zugabe von Cadaverin herangezogen. Als Negativkontrolle wurde das Polyamin Spermidin verwendet, welches *in vivo* keinen Einfluss auf das Cad-System zeigte (Neely *et al.*, 1994).

3.2.3.1 Veränderung der Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512 durch Cadaverin

Die Messungen der Tryptophanfluoreszenz wurden wie unter 2.5.10 beschrieben in 150 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7) und 150 mM NaCl bei 25°C durchgeführt. CadC188-512 wurde vor der Messung gegen diesen Puffer dialysiert. Die Titration von steigenden Cadaverin-Konzentrationen zu CadC188-512 führte zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität um ca. 20% bei 1 mM Cadaverin (Abb. 19A). Die Darstellung der Änderung der Fluoreszenzintensität als $\Delta F/F$ ergab deutlich höhere Werte im Vergleich zur Negativkontrolle Spermidin. So betrug $\Delta F/F$ bei 1 mM Cadaverin 0,2 ($\pm 0,007$), die Fluoreszenzveränderung, die durch 1 mM Spermidin hervorgerufen wurde, war $\Delta F/F = 0,13$ ($\pm 0,008$). Diese war somit ähnlich wie bei Pufferzugabe ohne Ligand und wurde deshalb als unspezifischer Effekt aufgrund der Verdünnung angesehen (Abb. 19B).

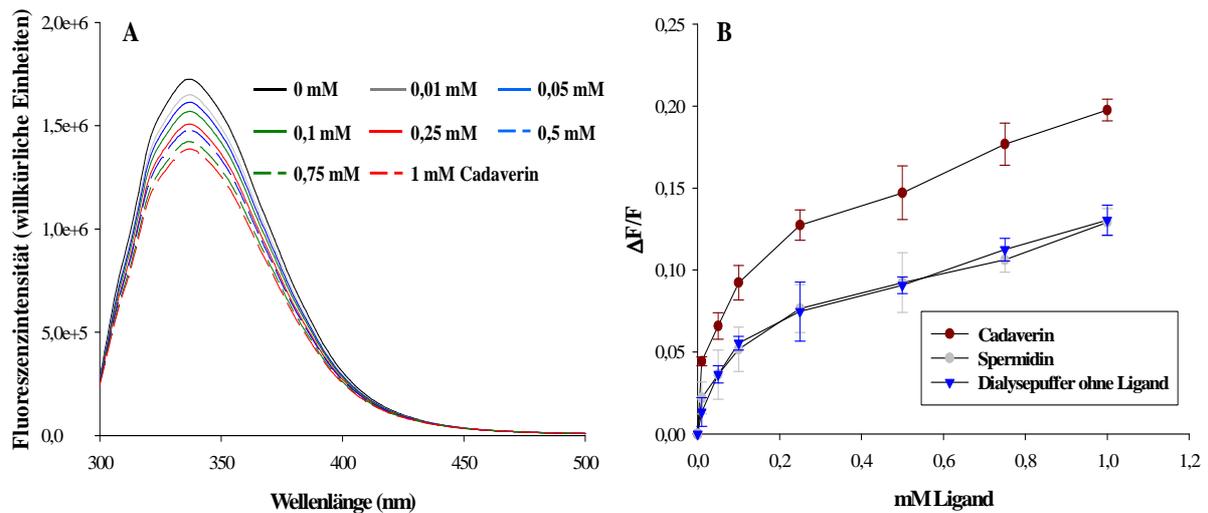


Abb. 19: Veränderung der Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512 durch Cadaverin, Spermidin und Dialysepuffer ohne Ligand

Zu 2,5 μM CadC188-512 wurden steigende Konzentrationen an Cadaverin bzw. Spermidin gegeben und das Emissionsspektrum zwischen 300 und 500 nm aufgenommen. Als weitere Kontrolle für unspezifische Veränderungen der Fluoreszenz aufgrund von Puffereffekten wurde Dialysepuffer ohne Ligand zu CadC188-512 titriert.

A: Fluoreszenzspektrum von CadC188-512 nach Zugabe von 0 bis 1 mM Cadaverin; das dargestellte Spektrum ist ein Mittelwert aus 3 Spektren.

B: Veränderungen in der Fluoreszenz von CadC188-512 nach Zugabe von Cadaverin, Spermidin und Dialysepuffer ohne Ligand; die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens 3 Messungen.

Wurde $\Delta F/F_{\text{Cadaverin}}$ mit dem Verdünnungsfaktor $\Delta F/F_{\text{Spermidin}}$ korrigiert, so ergab die Berechnung der Regression eine typische Sättigungskurve mit steigender Cadaverin-Konzentration (Abb. 20A). Die Auftragung der Daten in Form eines Scatchard-Plots (Scatchard, 1949) ermöglichte die Berechnung der Affinitätskonstante K_D , welche 96 (± 18) μM betrug (Abb. 20B). Somit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass CadC188-512 eine Affinität für Cadaverin aufweist.

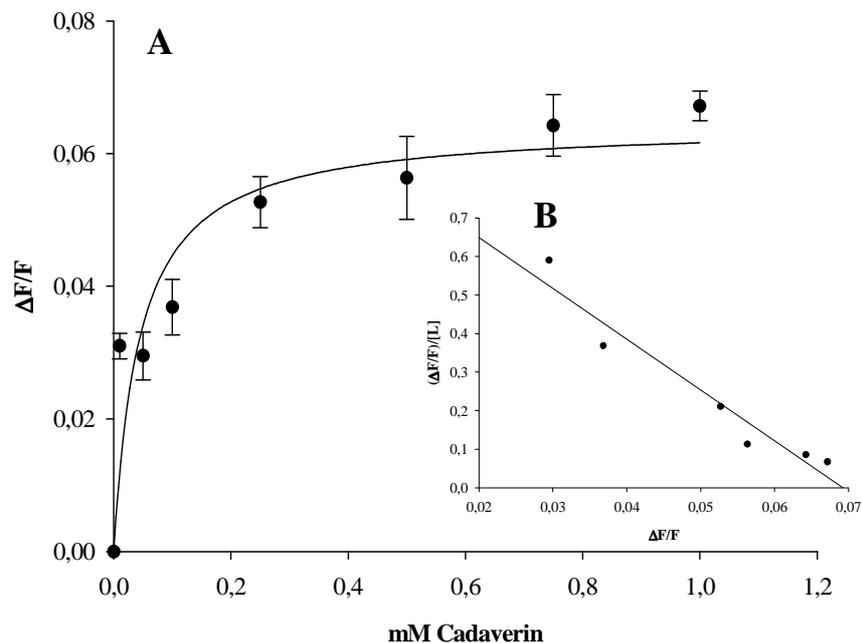


Abb. 20: Affinität von CadC188-512 für Cadaverin

A: Veränderungen in der Fluoreszenz durch Zugabe von Cadaverin, dargestellt als $\Delta F/F$, wobei ΔF die Veränderung in der maximalen Fluoreszenzintensität (337 nm) nach Zugabe von Cadaverin in der jeweiligen Konzentration ist, F ist die maximale Fluoreszenz ohne Zugabe von Cadaverin. Verdünnungseffekte wurden abgezogen. Die Berechnung der Regression wurde mit der Software SigmaPlot (Version 9.0; Systat Software) durchgeführt.

B: Auftragung der Daten nach Scatchard (1949). Dabei ist $K_D = -1/K_A$, wobei K_A die Assoziationskonstante darstellt, welche sich direkt aus der Steigung ergibt. Die Berechnung der Regression wurde mit der Software SigmaPlot (Version 9.0; Systat Software) durchgeführt.

3.2.3.2 Veränderung der Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512-R265C

Um den Einfluss der Aminosäuresubstitution R265C auf die Cadaverin-Affinität zu testen, wurden die gleichen Versuche mit CadC188-512-R265C durchgeführt. Die Zugabe von steigenden Mengen Cadaverin (bis zu 1 mM) resultierte in einer Abnahme der Fluoreszenzintensität um max. ca. 18% (Daten nicht gezeigt). Wurden von diesen Daten die unspezifischen Werte abgezogen, die sich aufgrund der Verdünnung ergaben, so erhielt man nach Berechnung der Regression ebenfalls eine Sättigungskurve, welche darauf hinweist, dass eine Affinität für Cadaverin vorhanden war (Abb. 21A). Durch die Darstellung der Daten in Form eines Scatchard-Plots (Scatchard, 1949) konnte anhand der Steigung ein K_D -Wert von $293 (\pm 172) \mu\text{M}$ ermittelt werden (Abb. 21B). Somit war die Affinität von CadC188-512-R265C um einen Faktor von 3,1 niedriger als die Affinität von CadC188-512 für Cadaverin, was mit den von Neely *et al.* (1994) erhaltenen *in vivo* Daten übereinstimmen würde.

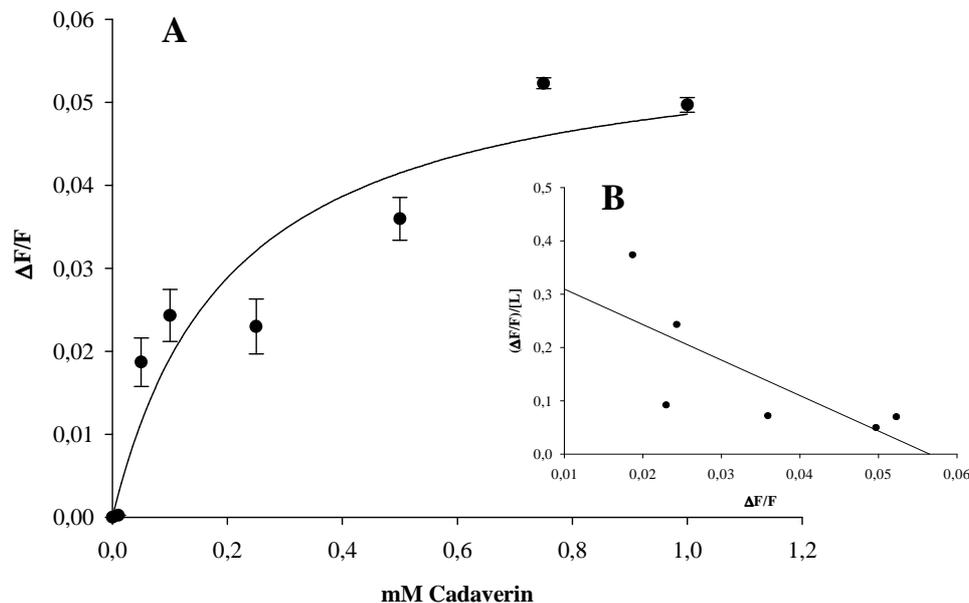


Abb. 21: Affinität von CadC188-512-R265C für Cadaverin

A: Veränderungen in der Fluoreszenz durch Zugabe von Cadaverin, dargestellt als $\Delta F/F$, wobei ΔF die Veränderung in der maximalen Fluoreszenzintensität (337 nm) nach Zugabe von Cadaverin in der jeweiligen Konzentration ist, F ist die maximale Fluoreszenz ohne Zugabe von Cadaverin. Verdünnungseffekte wurden abgezogen. Die Berechnung der Regression wurde mit der Software SigmaPlot (Version 9.0; Systat Software) durchgeführt.

B: Auftragung der Daten nach Scatchard (1949). Dabei ist $K_D = -1/K_A$, wobei K_A die Assoziationskonstante darstellt, welche sich direkt aus der Steigung ergibt. Die Berechnung der Regression wurde mit der Software SigmaPlot (Version 9.0; Systat Software) durchgeführt.

3.2.3.3 Hemmung der *cadBA*-Expression durch Cadaverin *in vivo*

Die beschriebenen Versuche konnten zeigen, dass die periplasmatische Domäne von CadC *in vitro* eine Affinität für Cadaverin aufweist. Im Folgenden sollte die Bedeutung der periplasmatischen Domäne für die negative Rückkopplung hinsichtlich des Cad-Systems *in vivo* bestätigt werden. Hierfür wurde *E. coli* EP314 mit den Plasmiden pBAD24-*cadC* und pBAD24-*cadC1-215* (Küper, 2005) transformiert. pBAD24-*cadC1-215* kodiert für die Aminosäuren 1 bis 215 von CadC, somit sind nur die ersten 28 Aminosäuren der periplasmatischen Domäne vorhanden. Bei einer Überproduktion von CadC1-215 wurde die *cadBA*-Expression induziert. Die Komplementation des *cadC*-negativen Stammes *E. coli* EP314 mit pBAD24-*cadC* benötigte jedoch die Repression des Promotors mit 0,2% (w/v) Glucose, um eine dem Wildtyp vergleichbare Regulation der *cadBA*-Expression zu erzielen (Küper, 2005; Kraxenberger, 2006). Damit die Menge von CadC und CadC1-215 in *E. coli* EP314 ungefähr gleich war, wurde bei diesem Experiment die Expression von *cadC* mit 0,2%

(w/v) Glucose reprimiert, die Expression von *cadC1-215* jedoch mit 0,05% (w/v) Arabinose induziert. Zusätzlich wurde die Kultivierung in LB-Medium (Maniatis *et al.*, 1982), pH 5,8, durchgeführt, um eine ausreichende Aktivierung der *cadBA*-Expression durch *cadC1-215* zu erzielen. Als Maß für die *cadBA*-Expression wurde die β -Galaktosidase-Aktivität (2.5.12) bestimmt

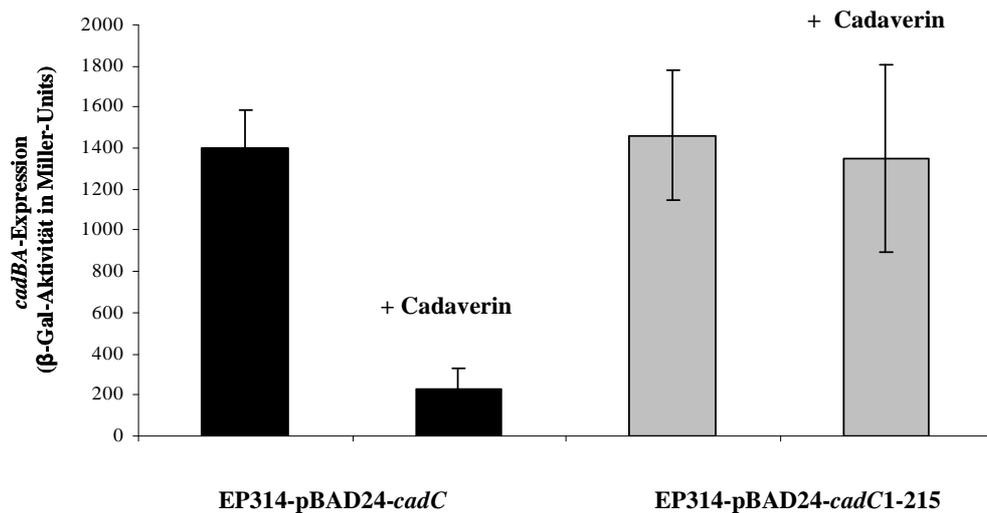


Abb. 22: Einfluss von CadC1-215 auf die Repression der *cadBA*-Expression durch Cadaverin

E. coli EP314 (*cadA-lacZ*-Fusion) wurde mikroaerob in 10 mL LB (eingestellt mit HCl auf pH 5,8) kultiviert und beim Übergang zur stationären Wachstumsphase geerntet. Wenn angegeben, enthielt das Medium 1,3 mM Cadaverin („+ Cadaverin“). Als Maß für *cadBA*-Expression wurde die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Damit der Level von CadC und CadC1-215 ungefähr gleich war, wurde die Genexpression in *E. coli* EP314-pBAD24-*cadC* mit 0,2% (w/v) Glucose reprimiert, in *E. coli* EP314-pBAD24-*cadC1-215* hingegen mit 0,05% (w/v) Arabinose induziert.

Während die Zugabe von 1,3 mM Cadaverin zum Wachstumsmedium zu einer deutlichen Reduktion der *cadBA*-Expression in EP314-pBAD24-*cadC* auf ca. 16% der Ausgangsaktivität führte [Reduktion von 1398 (\pm 189) auf 229 (\pm 100) Miller-Units], wurde die *cadBA*-Expression in EP314-pBAD24-*cadC1-215* durch Cadaverin kaum beeinflusst (Abb. 22). Hier wurden ohne Cadaverin 1464 (\pm 315) Miller-Units gemessen, die Zugabe von 1,3 mM Cadaverin reduzierte die Aktivität nur um ca. 8% [1351 (\pm 459) Miller-Units].

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung der periplasmatischen Domäne von CadC für die Wahrnehmung von Cadaverin und indizieren zusammen mit den unter 3.2.3.2 erhaltenen Resultaten eine direkte Interaktion zwischen der periplasmatischen Domäne von CadC und Cadaverin, welche zu einer Hemmung der *cadBA*-Expression führt.

3.3 Interaktion von CadC mit der Lysin-spezifischen Permease LysP

Die Lysin-spezifische Permease LysP wird als negativer Regulator des Cad-Systems unter nicht-induzierenden Bedingungen beschrieben, da zum einen Mutationen in *lysP* zu einer Expression des *cadBA*-Operons unabhängig vom Vorhandensein von Lysin führen, zum anderen hemmt die Überproduktion von LysP die *cadBA*-Expression bei ansonsten induzierenden Bedingungen (Popkin and Maas, 1980; Tabor *et al.*, 1980; Neely *et al.*, 1994; Kapitel 3.1.2 diese Arbeit). Die genaue Funktion von LysP bei der Inhibierung der *cadBA*-Expression ist jedoch unklar. So könnten CadC und LysP beide um das Substrat Lysin konkurrieren, wobei Lysin durch LysP in die Zelle transportiert wird und somit CadC nicht zur Verfügung steht. Erst bei höheren externen Lysin-Konzentrationen wäre dann ausreichend Lysin für die Aktivierung von CadC vorhanden. LysP könnte aber auch eine direkte Interaktion mit CadC eingehen und es unter nicht-induzierenden Bedingungen in einem inaktiven Zustand halten, Lysin würde dann die Interaktion beider Proteine beenden (Neely *et al.*, 1994). Da jedoch die unter 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Ergebnisse eine direkte Wahrnehmung von Lysin durch CadC unwahrscheinlich machen, kann eine Konkurrenz beider Proteine um Lysin ausgeschlossen werden. Um eine direkte Interaktion zwischen CadC und LysP zu bestätigen, sollte in der vorliegenden Arbeit zum einen die Repression der *cadBA*-Expression durch LysP *in vivo* charakterisiert werden, zum anderen sollte eine Interaktion beider Proteine *in vitro* mittels Quervernetzungsstudien untersucht werden. Ebenfalls von Interesse war die Frage, welche Rolle der Lysin-Transport durch LysP bei der Aufhebung der inhibitorischen Wirkung auf CadC spielt, sobald induzierende Bedingungen vorliegen.

3.3.1 *in vivo* Analyse der Interaktion von LysP mit CadC und CadC1-215

Da CadC selbst offenbar kein direkter Lysin-Sensor ist, war anzunehmen, dass die Lysin-Abhängigkeit der *cadBA*-Expression auf einer Interaktion von CadC und LysP beruht, die bei Vorhandensein von Lysin aufgelöst wird. Denkbar wäre eine Interaktion der periplasmatischen Domäne von CadC mit LysP, da zufällige Aminosäureaustausche in dieser Domäne in einer Lysin-unabhängigen *cadBA*-Expression resultierten (Dell *et al.*, 1994). Dieser Phänotyp lässt sich möglicherweise auf eine gestörte Interaktion zwischen CadC und LysP zurückführen. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Rolle der periplasmatischen Domäne bei einer Interaktion mit LysP *in vivo* genauer analysiert werden. Hierfür wurde der Stamm *E. coli* MG1655 Δ *cadC/lysP242* (*cadC/lysP*) wie unter 2.4.10 beschrieben hergestellt. Durch einen Basenaustausch in Nukleotid 242 (C \rightarrow A) wurde ein Stopp-Codon anstelle von

Serin eingeführt. Dadurch entstand eine stark verkürzte und inaktive Form von LysP, bestehend aus 80 Aminosäuren. Die Transformation von *MG1655ΔcadC/lysP242* mit pET16b-*cadC* führte zu einer Lysin-unabhängigen *cadBA*-Expression (Daten nicht gezeigt). *MG1655ΔcadC/lysP242* wurde anschließend mit den Plasmiden pBAD24-*cadC* bzw. pBAD24-*cadC1-215* transformiert. pBAD24-*cadC1-215* kodiert für die Aminosäuren 1-215, d. h. von der periplasmatischen Domäne sind nur die ersten 28 Aminosäuren enthalten. Da CadC1-215 die *cadBA*-Expression nur bei einer Überproduktion aktiviert (Küper, 2005), erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Induktion der Genexpression mit 0,2% (w/v) Arabinose. Man muss jedoch beachten, dass die *cadBA*-Expression bei einer hohen *cadC*-Kopienzahl pH-unabhängig (Küper, 2005) und Lysin-unabhängig (eigene, nicht gezeigte Daten) aktiviert wird. Gleichzeitig mit pBAD24-*cadC* bzw. pBAD24-*cadC1-215* wurde *E. coli* *MG1655ΔcadC/lysP242* mit pBAD33-*lysP* transformiert. Die Co-Transformation von pBAD24 und pBAD33 eignet sich aufgrund verschiedener Replikationsursprünge und unterschiedlicher Antibiotikaresistenzen der beiden Vektoren sehr gut zur gleichzeitigen Expression unterschiedlicher Gene (Guzman *et al.*, 1995). Anschließend wurde *E. coli* *MG1655ΔcadC/lysP242* (transformiert mit pBAD24-*cadC*, pBAD24-*cadC*/pBAD33-*lysP*, pBAD24-*cadC1-215* bzw. pBAD24-*cadC1-215*/pBAD33-*lysP*) wie unter 2.3.7 beschrieben kultiviert und die Genexpression mit 0,2% (w/v) Arabinose induziert. Nach 3 h wurden Proben für die Bestimmung der spezifischen CadA-Aktivität (als Maß für die *cadBA*-Expression) entnommen, gleichzeitig wurde mittels Western Blot überprüft, ob ungefähr gleiche Mengen von CadC und LysP bzw. CadC1-215 und LysP produziert wurden.

Es stellte sich heraus, dass die *cadBA*-Expression gehemmt wurde, sobald LysP anwesend war, was sich an einer deutlichen Reduktion der spezifischen CadA-Aktivität zeigte (Abb. 23A). So wurde bei einer Überproduktion von CadC in *E. coli* *MG1655ΔcadC/lysP242*-pBAD24-*cadC* eine spezifische CadA-Aktivität von $0,90 (\pm 0,32) \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$ gemessen, die gleichzeitige Überproduktion von LysP (*E. coli* *MG1655ΔcadC/lysP242*-pBAD24-*cadC*/pBAD33-*lysP*) reduzierte die CadA-Aktivität auf $0,37 (\pm 0,14) \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$. Dies waren nur noch 41% der Ausgangsaktivität.

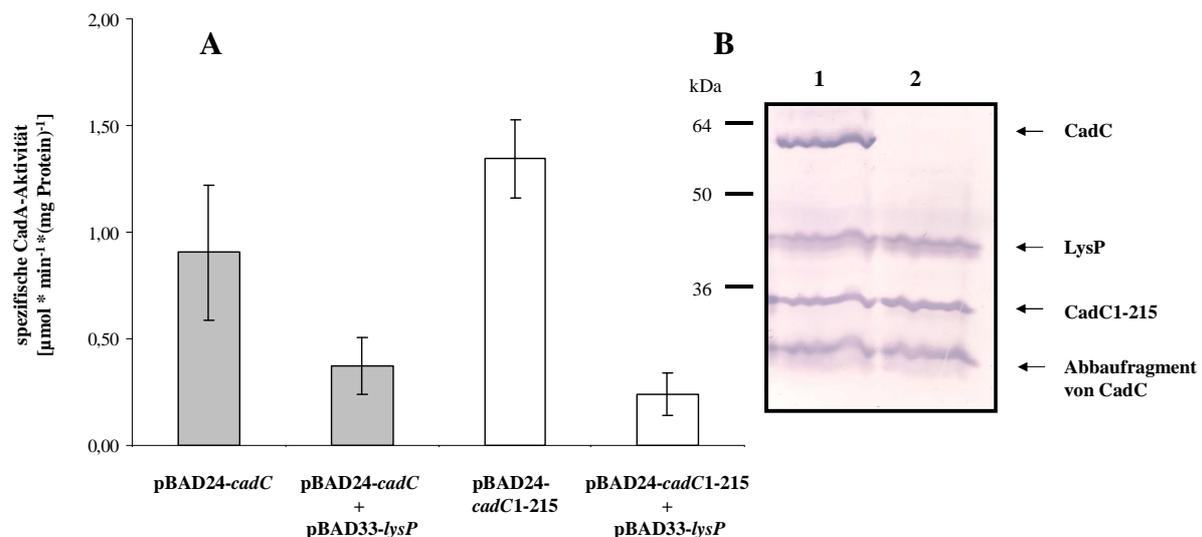


Abb. 23: Repression der *cadBA*-Expression durch LysP in Gegenwart von CadC bzw. CadC1-215

E. coli MG1655 Δ *cadC/lysP242* (nach Transformation mit pBAD24-*cadC* bzw. pBAD24-*cadC* und pBAD33-*lysP*, oder mit pBAD24-*cadC1-215* bzw. pBAD24-*cadC1-215* und pBAD33-*lysP*) wurde in LB-Medium aerob bei pH 7 bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert, die Expression der Gene wurde mit 0,2% (w/v) Arabinose für 3 h durchgeführt. Dann wurden Proben für die Messung der spezifischen CadA-Aktivität sowie für einen Western Blot entnommen.

A: Bestimmung der spezifischen CadA-Aktivität als Maß für die Expression von *cadBA*.

B: Überprüfung der Proteinmengen mittels Western Blot. Es wurden jeweils 30 μg Gesamtprotein aufgetragen. Als 1. Antikörper wurde ein Penta-His-Antikörper verwendet, der 2. Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Maus-IgG. **Spur 1:** Zellextrakt von *E. coli* MG1655 Δ *cadC/lysP242*-pBAD24-*cadC*/pBAD33-*lysP*; **Spur 2:** Zellextrakt von *E. coli* MG1655 Δ *cadC/lysP242*-pBAD24-*cadC1-215*/pBAD33-*lysP*

Wurde nur CadC1-215 überproduziert (*E. coli* MG1655 Δ *cadC/lysP242*-pBAD24-*cadC1-215*), so ergab sich eine spezifische CadA-Aktivität von $1,34 (\pm 0,18) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$. Wurde gleichzeitig LysP überproduziert, so wurde eine CadA-Aktivität von $0,24 (\pm 0,10) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ gemessen. Dies entsprach nur noch 18% der Ausgangsaktivität (Abb. 23A). Somit hatte die Überproduktion von LysP auch dann einen inhibitorischen Effekt auf das Cad-System, wenn die periplasmatische Domäne von CadC nicht vorhanden war. Warum hier der Effekt noch größer war als bei dem vollständigen CadC ist unklar. Die Überprüfung der produzierten Proteinmengen konnte ausschließen, dass die dargestellten Effekte auf unterschiedlichen Mengen der co-produzierten Proteine beruhten, da sowohl ungefähr gleiche Mengen CadC und LysP (Abb. 23B; Spur 1) als auch gleiche Mengen CadC1-215 und LysP (Abb. 23B; Spur 2) gebildet wurden. Interessanterweise wies CadC zwei Abbaubanden auf, von denen die größere möglicherweise CadC1-215 entsprach

(Bande bei ca. 35 kDa), die kleinere, die auch in Spur 2 zu sehen ist, ist wahrscheinlich ein C-terminales Abbauprodukt, das bereits früher beschrieben worden war (Küper, 2005).

Dieses Ergebnis bestätigt eine Interaktion zwischen CadC und LysP, jedoch scheint das Vorhandensein der periplasmatischen Domäne von CadC für die Repression durch LysP nicht nötig zu sein, somit findet die Interaktion mit LysP nicht über die C-terminale Domäne von CadC statt.

3.3.2 *in vitro* Versuche zur Interaktion von CadC und LysP

Um eine direkte Interaktion zwischen CadC und LysP *in vitro* zu untersuchen, wurden Studien mit dem chemischen Quervernetzer Disuccinimidylsuberat (DSS) durchgeführt. Hierfür wurden LysP und CadC zusammen in *E. coli* Proteoliposomen co-rekonstituiert und mit DSS wie unter 2.5.6 beschrieben inkubiert. DSS ist membranpermeabel und kann somit Proteine, die nahe in der Membran zusammen liegen, verknüpfen (Spannweite: 11,4 Å). DSS reagiert mit primären Aminogruppen und bildet dabei stabile Amidbindungen aus.

Waren LysP und CadC zusammen in Proteoliposomen rekonstituiert, so verringerte sich die Menge der CadC- und LysP-Monomere nach Zugabe des Quervernetzers. Stattdessen konnte ein hochmolekularer Komplex (> 200 kDa) detektiert werden (Abb. 24: Spur 5 und 6). Dies war nicht der Fall, wenn beide Proteine einzeln in den Proteoliposomen vorlagen (Abb. 24, Spur 1-4). Wurde CadC mit dem Natrium-Prolin-Symporter PutP (Jung *et al.*, 1998) co-rekonstituiert, so war die Reduktion der CadC- und LysP-Monomere nach Inkubation mit DSS weniger ausgeprägt. Des Weiteren war kein Proteinkomplex aus quervernetzten Proteinen zu sehen, jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dieser nicht in das Trenngel gewandert war. Dennoch sprach dieses Ergebnis dafür, dass CadC und LysP eine räumliche Nähe in den Phospholipiden aufwiesen.

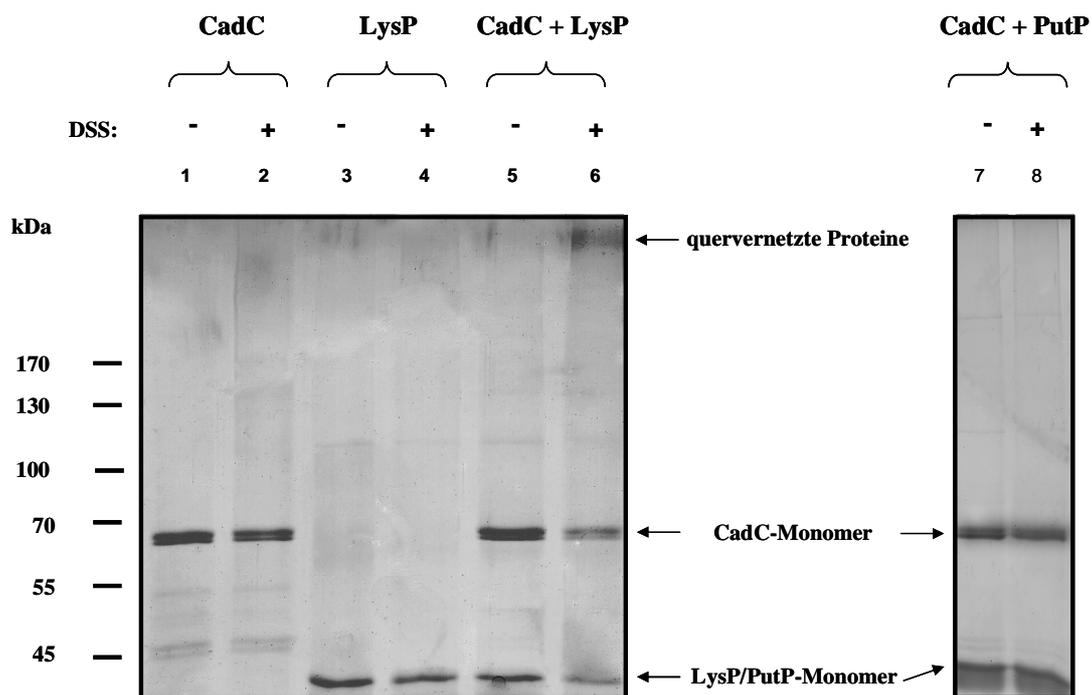


Abb. 24: Quervernetzung von CadC und LysP in Proteoliposomen

Proteoliposomen mit CadC, LysP, CadC und LysP bzw. CadC und PutP wurden mit DSS für 15 min bei RT inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) wurden die Proben in einem 7,5% SDS-Gel analysiert. Die Inkubation von co-rekonstituiertem LysP und CadC führte zu einer Abnahme der Menge an Monomeren, während gleichzeitig ein hochmolekularer Proteinkomplex entstand. **Spur 1:** 5 μ M CadC; **Spur 2:** 5 μ M CadC, 50 μ M DSS; **Spur 3:** 5 μ M LysP; **Spur 4:** 5 μ M LysP, 50 μ M DSS; **Spur 5:** 10 μ M CadC + LysP; **Spur 6:** 10 μ M CadC + LysP, 100 μ M DSS; **Spur 7:** 10 μ M CadC + PutP; **Spur 8:** 10 μ M CadC + PutP, 100 μ M DSS

3.3.3 Hemmung der *cadBA*-Expression durch ein Transport-inaktives *lysP*-Derivat

Die Lysin-spezifische Permease LysP erfüllt in *E. coli* zwei Funktionen: zum einen transportiert LysP Lysin in die Zelle, zum anderen spielt dieses Protein eine Rolle bei der Regulation des *cadBA*-Operons, wahrscheinlich über eine Interaktion mit CadC, die bei Anwesenheit von Lysin aufgehoben wird. Unklar ist jedoch, wie die Aufhebung der Interaktion zwischen CadC und LysP erfolgt. In früheren Arbeiten wurden Thiosin-resistente *lysP*-Mutanten beschrieben, in denen die *cadBA*-Expression Lysin-unabhängig induziert wird (Popkin and Maas, 1980; Tabor *et al.*, 1980; Neely *et al.*, 1994; Kapitel 3.1.2 diese Arbeit). Diese Mutanten hatten alle eine fehlende Transportfunktion (Thiosin-Resistenz) und eine fehlende Interaktion mit CadC (Lysin-unabhängige *cadBA*-Expression) gemeinsam. Diese Ergebnisse indizieren, dass durch das Vorhandensein von Lysin die Konformation von LysP verändert wird, so dass der Transport von Lysin erfolgen kann. Im Folgenden sollte geklärt werden, wie die Fähigkeit von LysP, Lysin zu transportieren mit der Regulation der *cadBA*-

Expression zusammen hängt. Hierzu wurden *lysP*-Mutanten von *E. coli* MG1655 mit Hilfe von Thiosin wie unter 2.4.10 beschrieben selektiert. Thiosin-resistente *E. coli* MG1655-Derivate Klone wurden dann durch die Bestimmung der spezifischen CadA-Aktivität (2.5.13) als Maß für die *cadBA*-Expression charakterisiert. Auf diese Weise wurde das Derivat *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S erhalten. Die Transformation mit pT-*lysP* hob die Thiosin-Resistenz vollständig auf (MG1655-*lysP*-G153S-pT-*lysP*). Wurde jedoch der Thiosin-resistente Stamm MG1655-*lysP211* (wird durch Zugabe eines funktionellen LysP Thiosin-sensitiv, vgl. Abb. 5A,B) mit pT-*lysP*-G153S transformiert, so wurde die Resistenz gegenüber Thiosin dennoch beibehalten (Abb. 25A). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Thiosin-Resistenz aufgrund eines verminderten Lysin-Transports erfolgte. Die Analyse der Sequenz zeigte einen Basenaustausch von G nach A an Position 457, der in einem Aminosäureaustausch von Glycin nach Serin an Position 153 der Aminosäuresequenz resultierte (Daten nicht gezeigt).

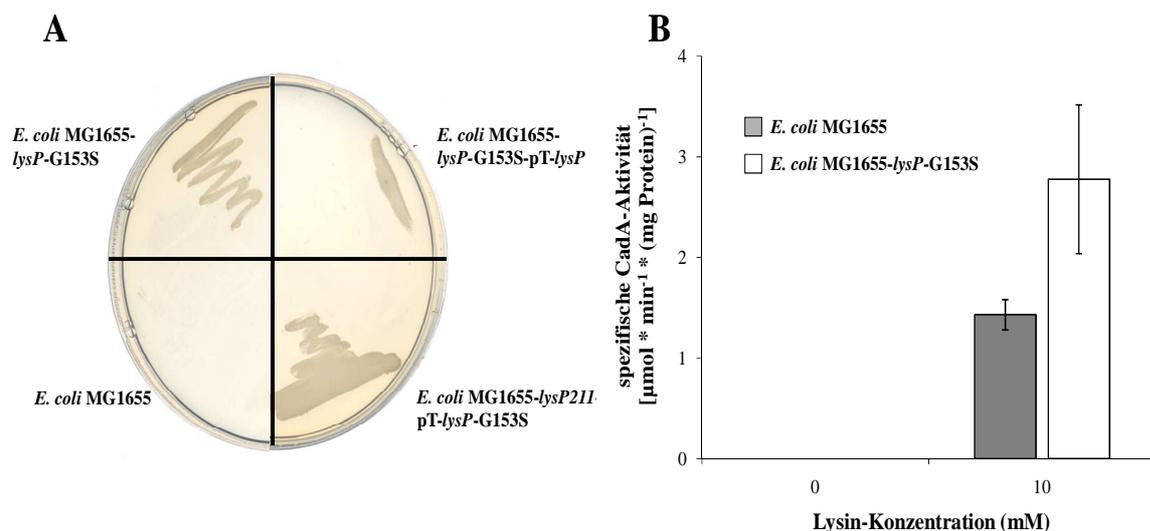


Abb. 25: Thiosin-Resistenz von *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S und Lysin-Abhängigkeit der *cadBA*-Expression

A: *E. coli* MG1655 (WT) und *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S wurden in Minimalmedium kultiviert und anschließend auf Minimalmedium-Platten, die 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Thiosin enthielten, ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Die Transformation von *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S mit pT-*lysP*, welches für ein funktionelles LysP kodiert, hob die Thiosin-Resistenz vollständig auf. Durch die Transformation von *E. coli* MG1655-*lysP211* mit pT-*lysP*-G153S wurde die Resistenz hingegen nicht aufgehoben.

B: *E. coli* MG1655 und *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S wurden mikroaerob in Minimalmedium (pH 5,8) kultiviert. Wenn angegeben, enthielt das Medium 10 mM Lysin. Die Zellen wurden geerntet und als Maß für die Expression von *cadBA* die spezifische CadA-Aktivität bestimmt. Die hohen spezifischen CadA-Aktivitäten im Vergleich zu den Werten, die bei der zeitabhängigen Analyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655 gemessen wurden (vgl. Abb. 4C) resultieren aus einer längeren Adaptationszeit der Zellen an die induzierenden Bedingungen.

MG1655-*lysP*-G153S wurde nun hinsichtlich des Lysin-Bedarfs für die Aktivierung der *cadBA*-Expression untersucht. Hierfür wurden *E. coli* MG1655 und *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S in KE-Medium, pH 5,8 mikroaerob kultiviert. Das Medium enthielt 0 bzw. 10 mM Lysin. Als Maß für die *cadBA*-Expression wurde die spezifische CadA-Aktivität bestimmt.

In *E. coli* MG1655 wurde, wie erwartet, nur bei Wachstum der Zellen in Gegenwart von Lysin das *cadBA*-Operon exprimiert, die spezifische CadA-Aktivität betrug $1,43 (\pm 0,15) \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$ (Abb. 25B). *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S wies eine deutlich erhöhte spezifische CadA-Aktivität auf, in Gegenwart von 10 mM Lysin wurden $2,78 (\pm 0,74) \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * (\text{mg Protein})^{-1}$ bestimmt. Dennoch war die *cadBA*-Expression, wie beim Wildtyp, strikt Lysin-abhängig (Abb. 25B).

Als nächstes wurde der Einfluss einer *LysP*- bzw. *LysP*-G153S-Überproduktion auf die Expression des *cadBA*-Operons analysiert. Hierfür wurde *E. coli* MG1655-*lysP211* mit den Plasmiden pT-*lysP* bzw. pT-*lysP*-G153S transformiert, anschließend wurden MG1655-*lysP211*, MG1655-*lysP211*-pT-*lysP* bzw. MG1655-*lysP211*-pT-*lysP*-G153S in LB-Medium (pH 5,8) mikroaerob inkubiert und die Genexpression mit 0,25 mM IPTG induziert.

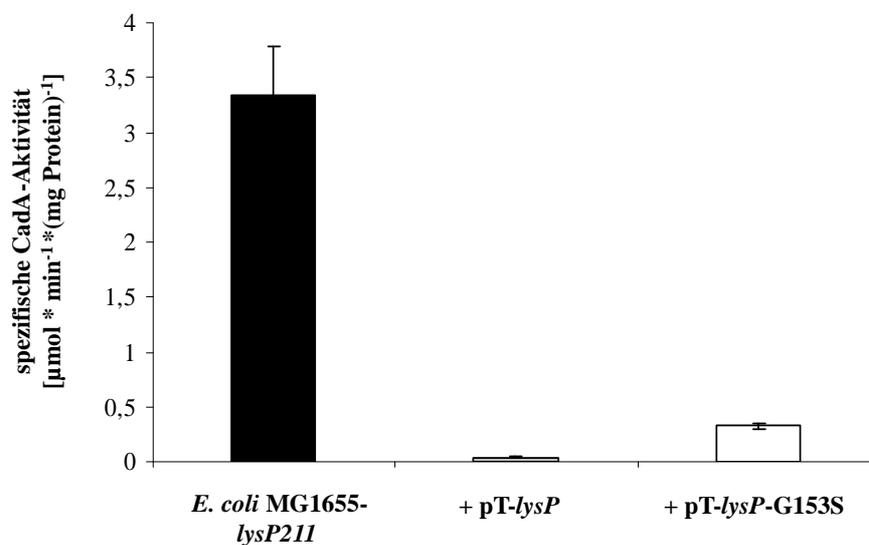


Abb. 26: Repression der *cadBA*-Expression durch *LysP* bzw. *LysP*-G153S bei induzierenden Bedingungen

Die *E. coli*-Stämme MG1655-*lysP211*, MG1655-*lysP211*-pT-*lysP* und MG1655-*lysP211*-pT-*lysP*-G153S wurden in LB-Medium (pH 5,8) mikroaerob inkubiert und die Genexpression mit 0,25 mM IPTG induziert. Als Maß für die *cadBA*-Expression wurde die spezifische CadA-Aktivität bestimmt. Die hohen spezifischen CadA-Aktivitäten im Vergleich zu den Werten, die bei der zeitabhängigen Analyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655-*lysP211* gemessen wurden (vgl. Abb. 7C) resultieren aus einer längeren Adaptationszeit der Zellen an die induzierenden Bedingungen.

Sowohl die Transformation mit pT-*lysP* als auch mit pT-*lysP-G153S* führte zu einer deutlichen Reduktion der *cadBA*-Expression in *E. coli* MG1655-*lysP211* (Abb. 26). Eine Erhöhung der Kopienzahl von *lysP* reduzierte diese auf ~ 1 % der Ausgangsexpression, eine Erhöhung der Kopienzahl von *lysP-G153S* auf ~ 10% der Ausgangsexpression. Offensichtlich war das Derivat LysP-G153S noch in der Lage, CadC zu inaktivieren und somit die *cadBA*-Expression zu reduzieren, wenn auch nicht so stark wie Wildtyp-LysP. Um auszuschließen, dass unterschiedliche Mengen an LysP und LysP-G153S produziert worden waren, wurden beide Proteine überproduziert (2.3.9) und der C-terminale His-Tag über Western Blot (2.5.8) nachgewiesen. Es wurden jedoch keine unterschiedlichen Mengen an Protein gebildet (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass LysP-G153S zwar kein Lysin transportieren kann, jedoch noch eine regulatorische Funktion bezüglich der *cadBA*-Expression ausübt. Die Interaktion von LysP-G153S mit CadC ist somit noch möglich und wird bei induzierenden Bedingungen durch Lysin aufgelöst. Somit ist der Transport von Lysin durch LysP nicht unbedingt Voraussetzung für die Aufhebung der Interaktion zwischen LysP und CadC.

3.4 Versuche zur Strukturaufklärung von CadC

Als Beispiel eines Transkriptionsaktivators aus der Familie der ToxR-ähnlichen Proteine sollte die Struktur von CadC in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Arne Skerra (Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München) mittels 3D-Kristallisation ermittelt werden. In einem Proteinkristall sind die atomaren Bausteine in dreidimensional periodischer Weise angeordnet und zeigen somit eine charakteristische Beugung von Röntgenstrahlen. Mit diesem Verfahren kann also die Anordnung der atomaren Teilchen eines Proteins und somit auch die Struktur erhalten werden. Für eine Strukturanalyse ist eine hochreine Proteinlösung mit möglichst wenigen Pufferkomponenten notwendig. Nach der Reinigung wird die Proteinlösung ankonzentriert (auf ca. 10 mg/mL) und verschiedenen Fällungsbedingungen ausgesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die *sitting drop*-Methode durchgeführt, hierbei befindet sich das Protein/Präzipitationsmittel-Gemisch auf einer Erhöhung im Kristallisationsraum. Da im Kristallisationsraum eine höhere Konzentration an Präzipitationsmittel vorliegt, tritt mit der Zeit Wasser aus dem Proteintropfen. Das Prinzip ist somit ein Aussalzen der Lösung und das Herabsetzen der Löslichkeit des Proteins.

CadC ist ein Protein, das in der Zelle drei Kompartimente besetzt, da es eine periplasmatische Domäne, eine cytoplasmatische Domäne und eine Transmembrandomäne aufweist (Dell *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1994), was eine effiziente Reinigung sehr schwierig macht. Da es oft einfacher ist Kristalle von einzelnen Protein-Domänen zu erhalten, sollte neben CadC auch die periplasmatische Domäne (CadC188-512) produziert und kristallisiert werden, da diese Domäne in einer Blast-Suche (Altschul *et al.*, 1990) keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Domänen aufwies. Zusätzlich sollte *in vitro* untersucht werden, ob die beiden Cysteinreste der periplasmatischen Domäne von CadC eine Disulfidbrücke ausbilden und *in vivo* deren physiologische Bedeutung analysiert werden.

3.4.1 Versuche zur Kristallisation von CadC188-512

Zunächst sollte die Struktur der periplasmatischen Domäne von CadC (CadC188-512) analysiert werden. Hierzu wurde versucht, eine saubere und hochkonzentrierte Proteinlösung für Kristallisationsansätze zu erhalten. Das gereinigte Protein sollte dann verschiedenen Fällungsbedingungen ausgesetzt werden.

3.4.1.1 Trennung von Thioredoxin und CadC188-512 mit Hilfe von Gelfiltration

Die Produktion und Reinigung der periplasmatischen Domäne als Fusionsprotein Trx-CadC188-512, sowie die Abspaltung von Thioredoxin mit Hilfe von Thrombin wurde wie unter 2.5.2.1 und 2.5.2.2 beschrieben durchgeführt (vgl. Abb. 12A,B). Es wurden in der Regel aus 50 mL Cytosol ca. 10 mg Hybridprotein erhalten. Da während der Abspaltung von Thrombin, der Ankonzentrierung und der Dialyse von CadC188-512 gegen 50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7) und 150 mM NaCl ein Teil des Proteins unspezifisch aggregierte, betrug die Ausbeute an CadC188-512 meistens nur ca. 50% der Ausgangsmenge an Hybridprotein.

Um das noch in der Proteinlösung vorhandene Thioredoxin zu entfernen, wurde eine weitere Reinigung über Gelfiltration durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die Trennung von Proteinen in Proteingemischen, die unterschiedliche relative Molekülmassen aufweisen und eignete sich somit für die Entfernung von Thioredoxin (14,1 kDa). Die relative Molekülgröße von CadC188-512 ist 40,7 kDa. Abhängig vom Erfolg der Reinigung wurden zwischen 1,4 mg und 3,5 mg Protein für die Gelfiltration eingesetzt.

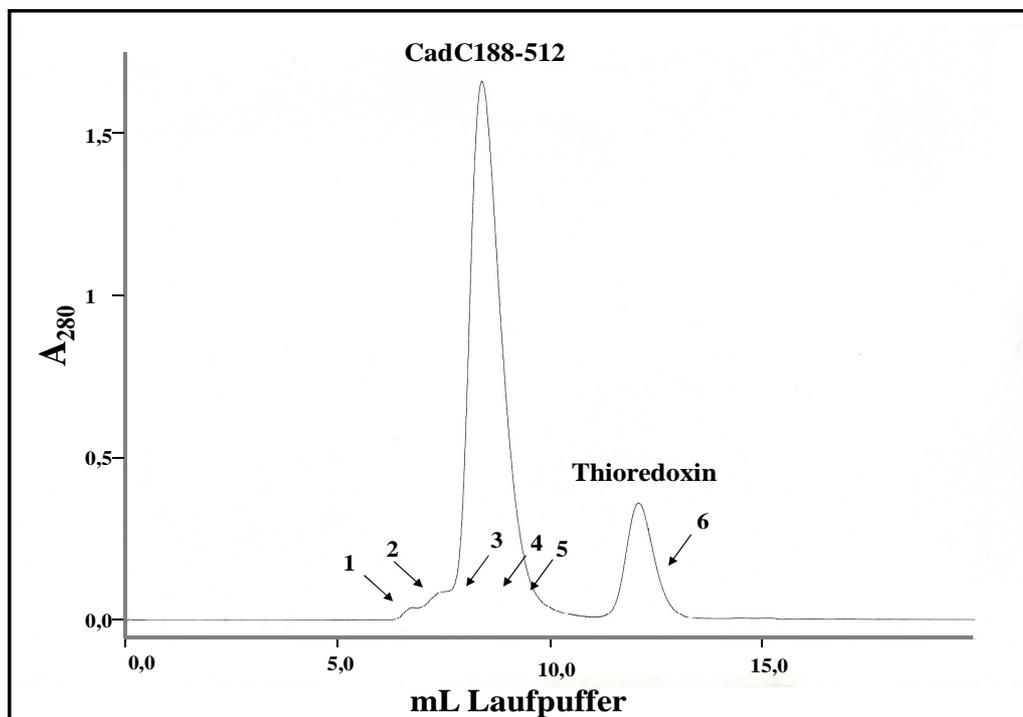


Abb. 27: Entfernung von Thioredoxin mittels Gelfiltration

Die Reinigung von CadC188-512 zur Abtrennung von Thioredoxin wurde mit einer analytischen Superdex-Säule S-75 am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München durchgeführt. Das Säulenvolumen betrug 25 mL, als Laufpuffer wurde 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) und 150 mM NaCl verwendet. Die Säule wurde vor dem Auftragen des Proteins mit diesem Puffer äquilibriert, die Umpufferung des Proteins von Natrium-Phosphatpuffer zu Tris-Puffer wurde direkt auf der Säule durchgeführt. Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,5 mL/min. Die einzelnen Fraktionen (200 - 600 μ L) wurden gesammelt und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Mit Hilfe der Gelfiltration konnten CadC188-512 und Thioredoxin gut voneinander getrennt werden, was sich im Chromatogramm in Form von 2 deutlichen Peaks zeigte (Abb. 27). CadC188-512 wurde von der Säule eluiert, nachdem ca. 7,7 mL Puffer durch die Säule gelaufen waren. Thioredoxin wurde nach ca. 11,3 mL Puffer von der Säule eluiert. Um zu überprüfen, ob die Trennung von CadC188-512 und Thioredoxin funktioniert hatte, wurden die einzelnen Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 28). In Spur 1 ist die Proteinlösung vor der Gelfiltration aufgetragen, die weiteren Spuren zeigen die Fraktionen 1 (Spur 2) und 2 (Spur 3) aus Abb. 27, welche möglicherweise aggregiertes CadC188-512 enthielten, Fraktionen 3-5 (Spur 4-6), welche dem in Abb. 27 dargestellten Hauptpeak entsprechen und Fraktion 6 (Spur 7), welche das Thioredoxin enthielt. Thioredoxin konnte somit größtenteils (ca. 98%) aus der Proteinlösung entfernt werden, die Reinheit der CadC188-512-Lösung betrug > 95%. Jedoch wurde in der Regel während der Gelfiltration bzw. beim anschließenden Ankonzentrieren der Proteinlösung ein Teil des Proteins durch Aggregation verloren, so dass letztendlich für die Kristallisationsansätze üblicherweise nur ca. 1 mg Protein verwendet werden konnte.

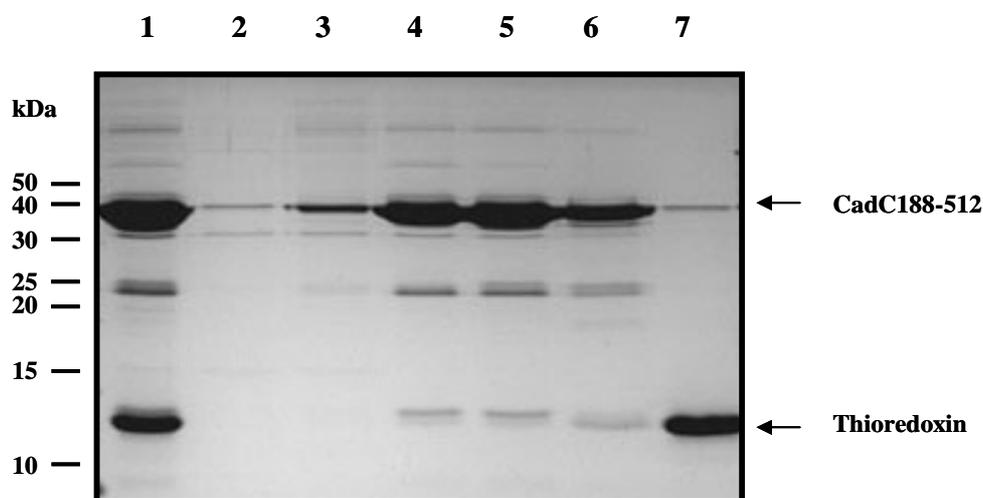


Abb. 28: SDS-Gelelektrophorese der Fraktionen aus der Gelfiltration

Aliquots der einzelnen Fraktionen der Reinigung wurden auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden mit Hilfe einer Coomassie-Färbung nach Weber und Osborn (1969) sichtbar gemacht.

Spur 1: CadC188-512 vor Gelfiltration, 2 μ L; **Spur 2:** Fraktion 1, 30 μ L; **Spur 3:** Fraktion 2, 30 μ L; **Spur 4:** Fraktion 3, 10 μ L; **Spur 5:** Fraktion 4, 10 μ L; **Spur 6:** Fraktion 5, 30 μ L; **Spur 7:** Fraktion 6, 20 μ L

3.4.1.2 Kristallisation von CadC188-512 und Messung am Synchrotron

Die Fraktionen 3-5 (vgl. Abb. 27 und 28) wurden vereinigt (ca. 1,4 mg CadC188-512) und auf ~ 10 mg/mL ankonzentriert. Diese Lösung wurde dann mit Hilfe eines Pipettier-Roboters (Tecan Freedom Evo®, Tecan) am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München in 96 Well-Mikrotiterplatten pipettiert und mit verschiedenen Fällungsreagenzien versetzt. Anschließend wurden die Platten bei 4°C inkubiert. Nach ca. 1 Woche entstanden mit 15% Ethanol und 0,1 M Tris/HCl (pH 7) kleine Kristalle, ein größerer Kristall entstand mit 1,6 M Ammoniumsulfat, 0,1 M NaCl und 0,1 M Hepes (pH 7,5). In Abb. 29A ist der größere Kristall unter dem Mikroskop dargestellt, welcher anschließend am Synchrotron vermessen wurde. Mit dieser Methode kann die Auflösung von Proteinstrukturen auf atomarer Ebene erfolgen. Die Messung wurde von Dr. Andreas Eichinger an der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung durchgeführt.

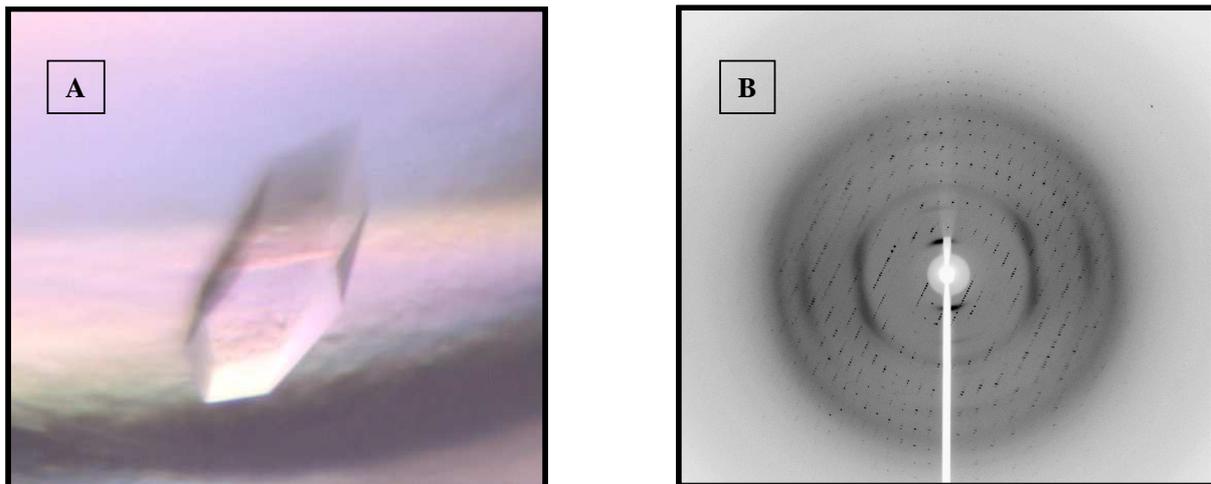


Abb. 29: Kristallisation von CadC188-512 und das Beugungsmuster des Kristalls

Die periplasmatische Domäne von CadC (CadC188-512) wurde mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration wie beschrieben gereinigt. Die Fraktionen 3, 4 und 5 der Gelfiltration wurden vereinigt (ca. 1,4 mg), ankonzentriert und für verschiedene Kristallisationsansätze verwendet. Die Messung der Streuung des Kristalls wurde an der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY) durchgeführt.

A: CadC188-512-Kristall unter dem Mikroskop, der Kristall entstand in Gegenwart von 1,6 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M NaCl, 0,1 M Hepes (pH 7,5).

B: Röntgenbeugungsaufnahme des Kristalls.

In Abb. 29B ist das Beugungsmuster des Kristalls dargestellt, welcher mit einer Auflösung bis ca. 2,5 Å streute. Jedoch war der Kristall nicht groß genug, um eine bessere Auflösung zu ergeben. Da für eine Strukturanalyse eines Proteins, bei dem es keine Homologien zu bereits

bekannten Proteinen gibt, eine Auflösung bis ca. 2 Å nötig ist, wurden neue Kristallisationsansätze angesetzt, um größere Kristalle zu erhalten, die eine bessere Streukraft besitzen.

3.4.2 Nachweis einer Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne von CadC

Ein Problem in der Kristallographie ist das so genannte Phasenproblem. Die an einem Kristall gebeugten Röntgenstrahlen werden durch die Hülle der Elektronen gestreut, d. h. letztendlich wird die Elektronendichte ermittelt (entspricht der dreidimensionalen Anordnung der Elektronen im Kristall) und nicht die exakte Anordnung der Atome. Für die Auflösung der Struktur eines Proteins werden experimentell die Reflex-Intensitäten der gestreuten Röntgenstrahlen bestimmt, welche der Amplitude einer elektromagnetischen Welle entsprechen. Wichtig für die Strukturauflösung ist auch die Phase, die zu jedem gestreuten Elektronenstrahl gehört, welche jedoch in der Regel nicht exakt gemessen werden kann. Dadurch ist eine genaue Bestimmung der atomaren Anordnung im Kristall nicht möglich. Deshalb bedient man sich häufig Schweratomverbindungen, welche eine größere Anzahl an Elektronen haben und somit die Röntgenstrahlen stärker streuen. Eine weitere Möglichkeit zur Phasenbestimmung ist die Nutzung von spezifischen Strahlenschäden, z. B. die Reduktion von Disulfidbrücken durch Radikale, womit sich die Position der Cysteine in einem Protein zuordnen lässt. Die periplasmatische Domäne von CadC enthält 2 Cysteinreste, C208 und C272. Da in der periplasmatischen Domäne oxidierende Bedingungen vorliegen, ist nicht auszuschließen, dass die beiden Cysteine eine Disulfidbrücke ausbilden. Das Vorhandensein einer Disulfidbrücke in CadC188-512 sollte nun *in vitro* überprüft und die physiologische Bedeutung mit Hilfe verschiedener CadC-Derivate *in vivo* charakterisiert werden.

3.4.2.1 PEG-Maleimid-Markierung von freien Cysteinen in CadC188-512

Polyethylenglycol-Maleimid [o-(2-Maleimidoethyl)-o'-methyl-polyethylenglycol 5,000] ist ein Thiol-selektives Reagenz, das mit freien Cysteinen in Proteinen eine stabile Thioether-Bindung eingeht. Eine erfolgte Markierung von Cysteinen kann durch das Auftreten von zusätzlichen (höhermolekularen) Proteinbanden bei einer SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Diese stellen die markierte Form des Proteins dar, da aufgrund einer Erhöhung des Molekulargewichts durch Polyethylenglycol-Maleimid (ca. 5 kDa) das Protein langsamer wandert. Das Vorhandensein einer Disulfidbrücke zeigt sich, wenn eine Markierung erst nach Zugabe eines Reduktionsmittels erfolgt. Als Reduktionsmittel wurde TCEP [Tris(2-Carboxyethyl)phosphin] gewählt, da Phosphine keine Thioether-Bindungen mit Polyethylenglycol-Maleimid eingehen können, wie z. B. DTT oder β-Mercaptoethanol. Um

zu gewährleisten, dass auch innerhalb des Proteins liegende Cysteinreste markiert werden konnten, erfolgte vor der Inkubation mit PEG-Maleimid eine Denaturierung mit 2% (w/v) SDS. Anschließend wurden die Ansätze in einem 12,5% SDS-Gel aufgetrennt.

Wurde CadC188-512 nicht mit TCEP reduziert, so erfolgte auch keine Markierung (Abb. 30, Spur 2), das Bandenmuster war wie bei der Kontrolle ohne Inkubation mit PEG-Maleimid (Spur 1). Dies zeigte, dass die Cysteinreste im Protein unter diesen Bedingungen keine freie Thiolgruppe aufwiesen. Nach Inkubation von reduziertem CadC188-512 mit PEG-Maleimid konnten, neben dem unmarkierten CadC188-512, 2 höhermolekulare Produkte detektiert werden (Spur 3). Diese entsprechen 1 und 2 markierten Cysteinresten. Zusätzlich ist das Thioredoxin zu sehen (14,1 kDa).

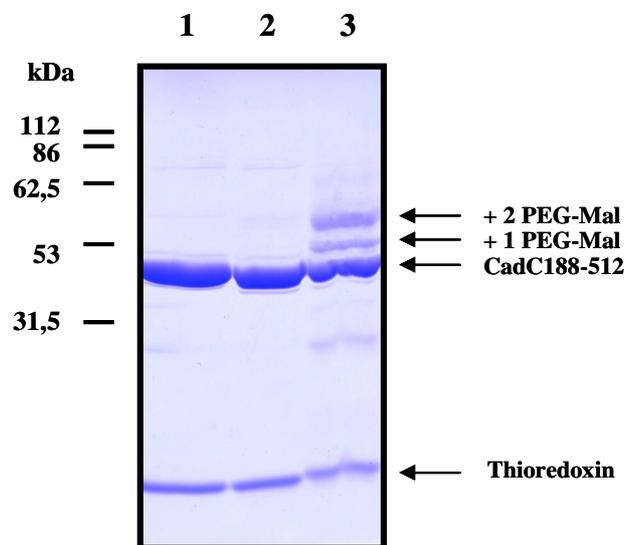


Abb. 30: Nachweis von freien Thiolen in CadC188-512 mittels PEG-Maleimid-Markierung

Für den Nachweis von freien Thiolgruppen wurde das Thiol-selektive PEG-Maleimid verwendet. Um eine bessere Zugänglichkeit von freien Thiolgruppen zu gewährleisten, wurden die Proteine mit 2% (w/v) SDS denaturiert. Die Markierung erfolgte mit 1 mM PEG-Maleimid für 1 h bei 37°C. Es wurden je 10 µg CadC188-512 auf ein 12,5% SDS-Gel nach Lämmli (1970) aufgetragen, die Sichtbarmachung der Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbung nach Weber und Osborn (1969).

Spur 1: Kontrolle ohne PEG-Maleimid; **Spur 2:** Markierung mit 1 mM PEG-Maleimid; **Spur 3:** Markierung mit 1 mM PEG-Maleimid nach Reduktion mit 1 mM TCEP

Die Tatsache, dass die Cysteinreste offenbar erst nach Reduktion von CadC188-512 zugänglich wurden, weist auf eine Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne von CadC hin.

3.4.2.2 Mobilität von reduziertem bzw. oxidiertem CadC188-512 im SDS-Gel

Während einer Proteinreinigung, vor allem unter nicht-reduzierenden Bedingungen, können andere Bestandteile des Cytosols (z. B. Glutathion) mit dem gewünschten Protein eine Disulfidbrücke ausbilden, und somit die Cysteine des gereinigten Proteins blockieren. Durch die Zugabe eines Reduktionsmittels werden diese dann freigesetzt, so dass die Cysteinreste des Proteins für das PEG-Maleimid zugänglich werden. Deshalb ist das unter 3.4.2.1 dargestellte Ergebnis nur ein Hinweis auf eine mögliche Disulfidbrücke zwischen C208 und C272 in der periplasmatischen Domäne von CadC. Eine weitere Möglichkeit, das Vorhandensein einer Disulfidbrücke nachzuweisen, ist die elektrophoretische Auftrennung des Proteins unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Hierfür wurde zu CadC188-512 Auftragspuffer ohne β -Mercaptoethanol bzw. mit 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol gegeben und die Ansätze dann auf ein 12,5 % SDS-Gel aufgetragen. Proteine mit intakter Disulfidbrücke zeigen ein anderes Mobilitätsverhalten im Vergleich zu Proteinen, bei denen die Disulfidbrücke reduziert vorliegt. In einem SDS-Gel erhält man dann Banden, die ein unterschiedliches Laufverhalten aufweisen.

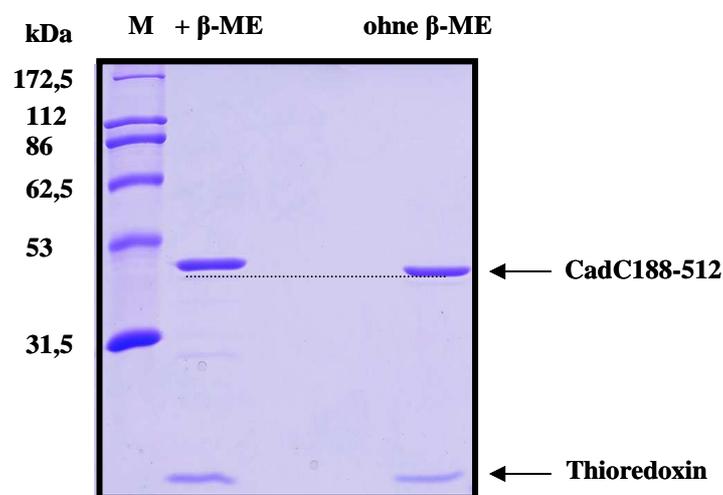


Abb. 31: Auftrennung von CadC188-512 im SDS-Gel unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen

Jeweils 2,5 μ g CadC188-512 wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen, wobei sich in einem Ansatz 5% (v/v) β -Mercaptoethanol (+ β -ME) befand, im anderen Ansatz kein Reduktionsmittel (ohne β -ME). Die Sichtbarmachung der Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbung nach Weber und Osborn (1969).

Spur 1: Standard; **Spur 2:** CadC188-512, Reduktion mit 5% (v/v) β -Mercaptoethanol; **Spur 3:** CadC188-512, ohne Reduktion

Die SDS-Gelelektrophorese von CadC188-512 unter reduzierenden bzw. oxidierenden Bedingungen machte ein unterschiedliches Laufverhalten des Proteins deutlich.

Reduziertes CadC188-512 wanderte langsamer als das nicht-reduzierte CadC188-512 (Abb. 31). Wurde Reduktionsmittel zu CadC188-512 gegeben, so waren die R_f -Werte niedriger als ohne Reduktionsmittel. Der Unterschied zwischen den R_f -Werten +/- β -Mercaptoethanol war $\Delta R_f = 0,0218 \pm 0,008$.

Dieses Ergebnis spricht für die Ausbildung einer Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne von CadC, welche möglicherweise eine kompaktere Struktur und deshalb eine erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit in der Gelelektrophorese bewirkte.

3.4.2.3 Einfluss von Reduktionsmittel auf die Cadaverin-Bindung

Da Disulfidbrücken in Proteinen meist eine strukturgebende Funktion ausüben, sollte deren Auflösung zu einer Strukturveränderung der periplasmatischen Domäne von CadC führen, die sich beispielsweise auf die Affinität von CadC188-512 für den negativen Regulator Cadaverin auswirken könnte. Hierzu wurde die Veränderung der Tryptophanfluoreszenz nach Titration von Cadaverin zu CadC188-512 gemessen, als Versuchspuffer wurde 150 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7) und 150 mM NaCl verwendet (2.5.10). Vor den Messungen wurde CadC188-512 mit 5 mM TCEP inkubiert.

Nach Korrektur der Daten aufgrund von Verdünnungseffekten ergab die Berechnung der Regression eine typische Sättigungskurve mit steigender Cadaverin-Konzentration (Abb. 32A). Die Auftragung der Daten in Form eines Scatchard-Plots (Scatchard, 1949) ermöglichte die Berechnung des K_D -Wertes als $124 (\pm 76) \mu\text{M}$ (Abb. 32B).

Die Reduktion von CadC188-512 resultierte also in einer nur leicht verminderten Affinität des Proteins für Cadaverin (Faktor 1,3 niedriger im Vergleich zu nicht-reduziertem CadC188-512, vgl. 3.2.3.1, $96 \mu\text{M}$), die Bindung von Cadaverin wurde somit durch evtl. Konformationsänderungen des Proteins (durch das Auflösen der Disulfidbrücke) kaum beeinflusst.

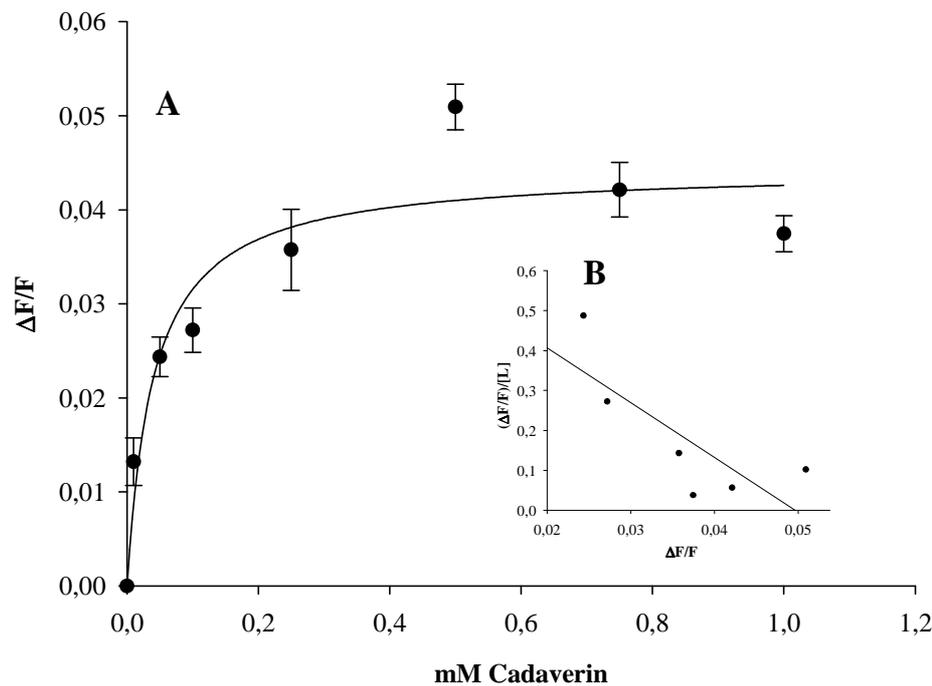


Abb. 32: Einfluss von TCEP auf die Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512

Zu 2,5 μM CadC188-512 wurden steigende Cadaverin-Konzentrationen titriert und die Veränderung der Tryptophanfluoreszenz bestimmt. Das Protein wurde vor der Messung 30 min mit 5 mM TCEP bei 37°C inkubiert.

A: Veränderungen in der Fluoreszenz durch Zugabe von Cadaverin; die Berechnung der Regression wurde mit der Software SigmaPlot (Version 9.0; Systat Software) durchgeführt.

B: Auftragung der Daten nach Scatchard (1949); die Berechnung der Regression wurde mit der Software SigmaPlot (Version 9.0; Systat Software) durchgeführt.

3.4.2.4 Physiologische Rolle der Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne

In einem nächsten Schritt wurde die physiologische Bedeutung der periplasmatischen Disulfidbrücke *in vivo* charakterisiert. Hierzu wurden die Cysteinreste der periplasmatischen Domäne gegen Alanin ausgetauscht und der Einfluss der Aminosäureaustausche auf die *cadBA*-Expression bei verschiedenen Wachstumsbedingungen anhand der β -Galaktosidase-Aktivität in *E. coli* EP314 getestet. Die Experimente wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Alexandra Dönhöfer durchgeführt (Dönhöfer, 2007), die von mir experimentell betreut wurde.

Wurden die Cysteine an Position 208 und 272 einzeln bzw. beide zusammen gegen Alanin ausgetauscht, so wurden zum einen deutlich höhere β -Galaktosidase-Aktivitäten im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Abb. 33A). So wurde in Stämmen, die Wildtyp-CadC produzierten, 195 (\pm 18) Miller-Units gemessen, in Stämmen, welche die CadC-Derivate mit den

Cysteinsubstitutionen produzierten, war die *cadBA*-Expression bis zu einem Faktor ~ 2 erhöht [C208A: 309 (± 16); C272A: 438 (± 39); C208A/C272A: 310 (± 14) Miller-Units]. Zum anderen wurde durch alle Derivate die *cadBA*-Expression Lysin-unabhängig aktiviert. Hier wurden β -Galaktosidase-Aktivitäten gemessen, die den Aktivitäten in Stämmen, die Wildtyp-CadC (in Gegenwart von Lysin) produzierten, entsprachen [C208: 152 (± 9); C272A: 202 (± 19); C208A/C272A: 125 (± 14) Miller-Units].

Wurde gleichzeitig LysP überproduziert, so konnte in Zellen, die WT-CadC produzierten (*E. coli* EP314-pET16b-*cadC*) eine deutliche Reduktion der *cadBA*-Expression festgestellt werden, die β -Galaktosidase-Aktivität wurde auf ca. 69% der Ausgangsaktivität gesenkt. In Zellen, die CadC-C272A produzierten (*E. coli* EP314-pET16b-*cadC*-C272A) blieb die *cadBA*-Expression jedoch unbeeinflusst von einer gleichzeitigen LysP-Überproduktion (Abb. 33B).

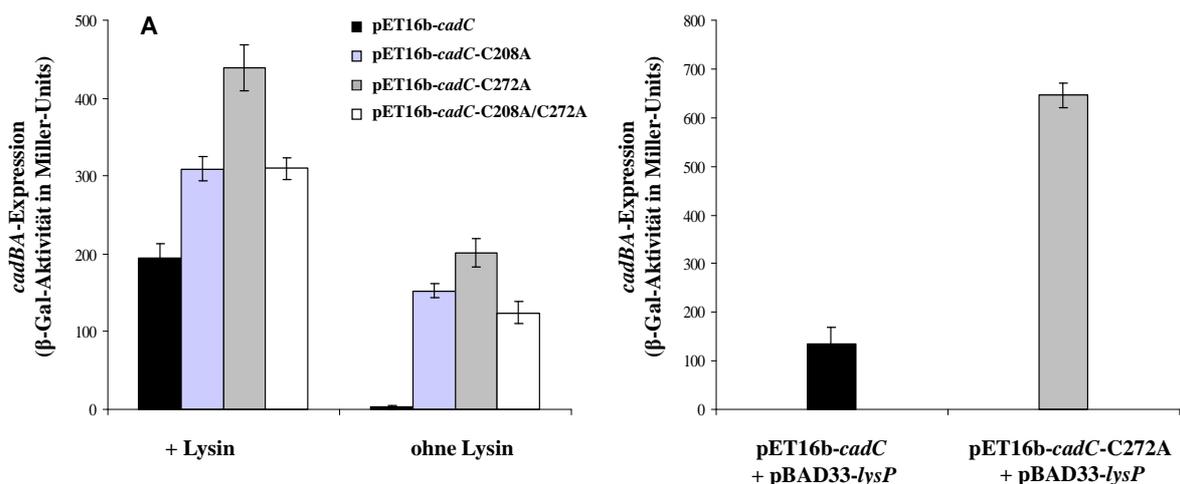


Abb. 33: Einfluss der CadC-Derivate C208A, C272A und C208A/C272A auf die *cadBA*-Expression in Abhängigkeit der externen Bedingungen

A: Die Kultivierung von *E. coli* EP314 (transformiert mit den entsprechenden Plasmiden) erfolgte in Minimalmedium, pH 5,8, unter mikroaeroben Bedingungen. Das Medium enthält, wenn angegeben, 10 mM Lysin. Als Maß für die *cadBA*-Expression wurde die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

B: *E. coli* EP314-pET16b-*cadC*/pBAD33-*lysP* bzw. *E. coli* EP314-*cadC*-C272A/pBAD33-*lysP* wurden mikroaerob in LB-Medium (pH 5,8) kultiviert. Die Genexpression von *lysP* wurde durch 0,2% (w/v) Arabinose für 3 h induziert. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität diente als Maß für die *cadBA*-Expression.

Die dargestellten Ergebnisse bestätigen eine physiologische Bedeutung der Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne von CadC, da zum einen das Auflösen der Disulfidbrücke zu einer Lysin-unabhängigen Aktivierung der *cadBA*-Expression führte, zum anderen schien die Wechselwirkung zwischen CadC und LysP gestört zu sein.

3.4.3 Optimierung der Reinigung von CadC

Die Produktion von CadC im Expressionssystem *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-*cadC*, die Solubilisierung des Proteins aus Membranvesikeln und die Reinigung über Ni²⁺-NTA-Agarose war zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits etabliert (Küper, 2001). Für Kristallisationsansätze mussten nun größere Mengen an Protein produziert werden. Dabei ergaben sich zwei Probleme: Zum einen war die Reinheit der Proteinlösung zu niedrig, sie betrug nur ca. 80%. CadC wurde zwar sehr gut angereichert, jedoch waren noch zahlreiche Abbauprodukte von CadC bzw. Proteinverunreinigungen auf dem SDS-Gel zu erkennen, welche möglicherweise eine Kristallisation des Proteins erschweren könnten (Abb. 34). Zum anderen bestand der Reinigungspuffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10 % (v/v) Glycerol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 600 mM NaCl und 0,2 % (v/v) LDAO, und enthielt somit hohe Konzentrationen an Glycerol, Reduktionsmittel, Salz und Detergenz, was für die Kristallisation nicht erwünscht war. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb die Reinigungs- und Pufferbedingungen optimiert werden.

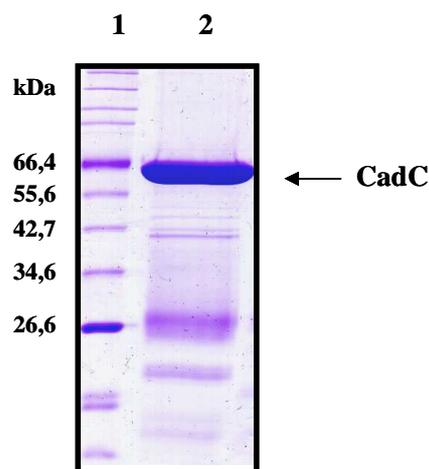


Abb. 34: Affinitätsreinigung von CadC über Ni²⁺-NTA-Agarose

CadC wurde aus Membranvesikeln von *E. coli* BL12(DE3)pLysS-pET16b-*cadC* mit 2% (v/v) LDAO solubilisiert und mit Hilfe von Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Der Reinigungspuffer bestand aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10% (v/v) Glycerol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 600 mM NaCl und 0,2 % (v/v) LDAO. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol.

Spur 1: Standard; **Spur 2:** Eluat Ni²⁺-NTA (20 μ g)

3.4.3.1 Reinigung von CadC über Affinitätschromatographie und Gelfiltration

Zunächst wurde CadC über Affinitätschromatographie gereinigt (2.5.2.4). Der Reinigungspuffer wurde hierfür modifiziert und bestand aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2 mM DTT, 600 mM NaCl, 0,05% (v/v) LDAO und 250 mM Imidazol. Mittels Dialyse wurde das Imidazol entfernt und die NaCl-Konzentration auf 300 mM gesenkt. Anschließend wurde CadC mit

Hilfe von Gelfiltration weiter gereinigt. Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2 mM DTT, 300 mM NaCl und 0,05% (v/v) LDAO verwendet. Für die Auftrennung der Proteine wurde eine Sephadex-Säule S-200 verwendet, welche zuvor mit dem Laufpuffer äquilibriert wurde. Es wurde ca. 1 mg Protein für die Gelfiltration eingesetzt. Während der Gelfiltration wurde nach ca. 7,6 mL Laufpuffer Protein eluiert, welches auf dem Chromatogramm als Peak zu erkennen ist, an den sich eine kleine Schulter anschließt (ca. 9,8 mL). Im weiteren Verlauf der Chromatographie wurden nach ~13,8 mL und nach 16 mL Laufpuffer Protein eluiert (Abb. 35).

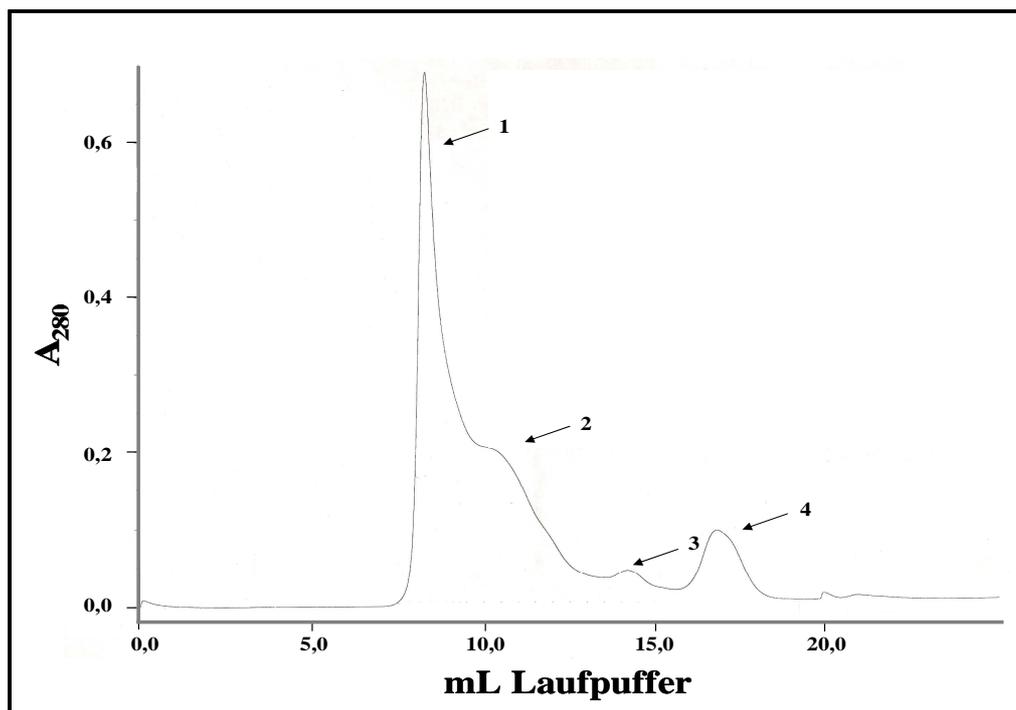


Abb. 35: Reinigung von CadC über Gelfiltration

Chromatogramm der Gelfiltration von CadC. Es wurde eine analytische Sephadex-Säule S-200 verwendet, die Durchführung erfolgte am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München. Das Säulenvolumen betrug 25 mL, als Laufpuffer wurde 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2 mM DTT, 300 mM NaCl und 0,05% (w/v) LDAO verwendet. Die Fraktionen der mit dem Pfeil gekennzeichneten Peaks (jeweils ca. 1000 μ L) wurden gesammelt und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Die einzelnen Fraktionen der Gelfiltration wurden gesammelt und die Reinheit der Proteinlösung in einem SDS-Gel überprüft (Abb. 36). So enthielten Fraktionen 1-3 CadC (Spur 1-3), die Reinheit betrug ca. 90%. Fraktion 4 enthielt ausschließlich Abbaufragmente oder unspezifisch an die Ni-NTA²⁺-Agarose gebundene Proteine (Spur 4). Die Fraktionen 1 und 2 wurden vereinigt (ca. 0,4 mg CadC), auf eine Konzentration von ~ 4 mg/mL ankonzentriert und mit verschiedenen Fällungreagenzien versetzt.

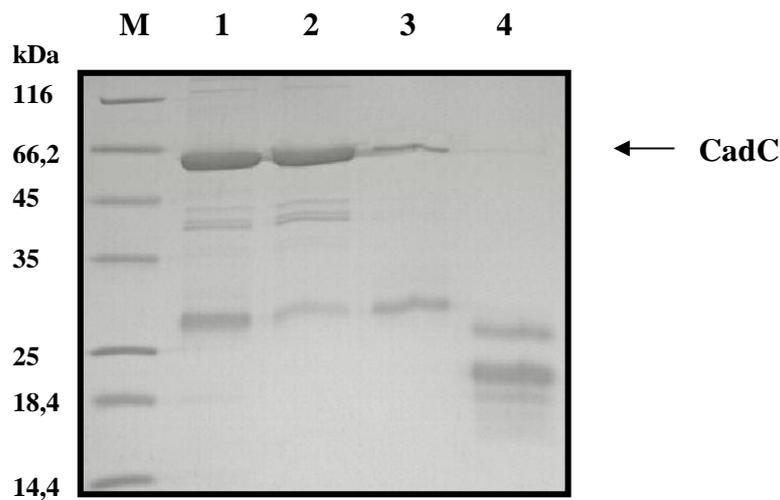


Abb. 36: SDS-Gel nach Reinigung von CadC über Affinitätschromatographie und Gelfiltration

Aliquots der einzelnen Fraktionen der Reinigung wurden auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München. Die Proteine wurden mit Hilfe einer Coomassie-Färbung nach Weber und Osborn (1969) sichtbar gemacht. Die einzelnen Fraktionen sind in Abb. 35 aufgeführt. **M:** Standard; **Spur 1:** Fraktion 1, 20 μL ; **Spur 2:** Fraktion 2, 30 μL ; **Spur 3:** Fraktion 3, 30 μL ; **Spur 4:** Fraktion 4, 30 μL

Bis zum Ende der vorliegenden Arbeit wurden jedoch keine Proteinkristalle erhalten, was möglicherweise zum einen mit einer zu geringen Reinheit der Proteinlösung zusammenhängt, zum anderen indiziert das Chromatogramm in Abb. 35, dass CadC nicht in einer monodispersen Lösung vorlag, da es in mehreren Schritten von der Säule eluiert wurde, was ebenfalls eine Kristallisation erschweren könnte.

Ein Problem bei der Reinigung von Membranproteinen über Gelfiltration liegt darin, dass zusammen mit dem gewünschten Protein weitere Proteine oder Proteinfragmente in einer Mizelle vorliegen können. Diese würden zusammen mit dem Zielprotein eluiert werden, somit könnten durch Gelfiltration diese Proteine nicht von CadC getrennt werden. Deshalb war das nächste Ziel, bereits durch die Affinitätschromatographie eine höhere Reinheit der Proteinlösung zu erzielen. Hierfür erfolgten u. a. Vorversuche, bei denen zusätzlich zur Reinigung von CadC mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie (2.5.2.4) eine Ionenaustauschchromatographie (als Matrix wurde Q-Sepharose verwendet) durchgeführt wurde. Jedoch führte dies nicht zu einem höheren Reinheitsgrad der Proteinlösung (Daten nicht gezeigt). Im Laufe dieser Arbeit gelang es somit nicht, CadC in einer ausreichend hohen Reinheit zu erhalten.

4. Diskussion

4.1 Transkriptions- und Translationsanalyse des Cad-Systems von *E. coli*

Das Cad-System von *E. coli* gehört zu den Säure-induzierbaren Aminosäure-Decarboxylase-Systemen und ist Teil der Säureschutzantwort. Neben einem niedrigen pH-Wert ist das Vorhandensein von Lysin für die Induktion des Cad-Systems essentiell. In der vorliegenden Arbeit wurde eine detaillierte, zeitabhängige Analyse dieses Systems auf Transkriptions- und auf Translationsebene in *E. coli* MG1655, *E. coli* MG1655-*lysP211* und *E. coli* MG1655 Δ *ravA* durchgeführt und anhand dieser Daten *in silico* ein mathematisches Modell des Cad-Systems entwickelt. Die mathematische Modellierung von Signaltransduktionssystemen ist ein nützliches Werkzeug für das Verständnis dieser komplexen, zellulären Vorgänge. Das Cad-System eignet sich besonders gut für eine Modellierung, da die Signaltransduktion von einem einzigen Protein (CadC) vermittelt wird und somit das System relativ einfach ist. Außerdem können die einzelnen Komponenten des Cad-Systems (*cadBA* Expression, relative CadA-Menge, extrazelluläres Cadaverin) sehr gut experimentell bestimmt werden. Zusätzlich sind bereits zahlreiche Daten aus der Literatur bekannt, die in das Modell integriert werden können.

4.1.1 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655 (Wildtyp)

Wurde *E. coli* MG1655 zunächst bei nicht-induzierenden Bedingungen (pH 7,6, kein Lysin) und anschließend bei induzierenden Bedingungen (pH 5,8, 10 mM Lysin) kultiviert, kam es zu einem schnellen Anstieg der *cadBA*-Transkription, mit einer maximalen Transkript-Menge 25 min nach Induktion. Obwohl noch induzierende Bedingungen vorlagen sank die Menge an *cadBA*-mRNA rasch wieder ab. Bereits durchgeführte zeitabhängige Analysen mit *E. coli* MG1655 beschrieben ebenfalls eine schnelle Abnahme der *cadBA*-Transkript-Menge, jedoch erfolgte hier das Wachstum der Zellen in LB-Medium, d. h. Lysin war bereits vor dem pH-Signal anwesend. Die *cadBA*-Expression war in dieser Arbeit ebenfalls transient und ein Maximum an Transkript wurde bereits nach 15 min erhalten (Küper, 2005; Gonzalez *et al.*, 2007). Dies könnte an allgemein besseren Bedingungen für die Zellen durch Wachstum in einem Vollmedium liegen. Ein weiterer Grund könnte aber auch sein, dass in LB-Medium Lysin bereits von Anfang an vorhanden war. Frühere Arbeiten beschrieben bereits diese schnelle, transiente *cadBA*-Expression in einem *E. coli* Wildtyp-Stamm, mit einer sehr kurzen Halbwertszeit der *cadBA*-mRNA, die über *Primer-Extensions*-Analysen ermittelt wurde. Es

konnte damals gezeigt werden, dass die Transkription sofort nach Zugabe des zweiten Signals begann, wenn eines der Signale bereits vorhanden war. Waren beide Signale jedoch gleichzeitig vorhanden, so war der Beginn der *cadBA*-Transkription verzögert und die Menge an *cadBA*-mRNA geringer (Neely und Olson, 1996).

Um die relative Menge der Lysin-Decarboxylase CadA zu messen, wurde die spezifische CadA-Aktivität in zellfreien Extrakten ermittelt. Diese stieg ca. 20 min nach der Induktion an, erfolgte also mit einigen Minuten Verzögerung zur Expression von *cadBA*. Ab 60 min blieb die relative Menge an CadA im weiteren Verlauf des Experiments stabil.

Durch die Lysin-Decarboxylierung wurde Cadaverin gebildet, das durch den Antiporter CadB nach außen transportiert wurde und eine negative Rückkopplung auf die *cadBA*-Expression bewirkte. Nach 60 min wurden ca. 1,6 mM Cadaverin im Kulturüberstand detektiert, dies korrelierte mit dem Zeitpunkt an dem kaum noch *cadBA*-Transkript vorhanden war. Neely *et al.* (1994) konnten zeigen, dass durch 1,3 mM Cadaverin die Expression einer *cadA-lacZ*-Fusion vollständig inhibiert wurde. Am Ende des Experiments wurden 6 mM Cadaverin detektiert. Frühere Analysen konnten zeigen, dass gleichzeitig mit der Erhöhung der Cadaverin-Konzentration die Lysin-Konzentration im Medium abnahm (Küper, 2005; Gonzalez *et al.*, 2007).

4.1.2 Zeitabhängige Analyse des Cad-Systems in *E. coli* MG1655-*lysP211*

Die zeitabhängige Analyse des Cad-Systems bei Wachstum von *E. coli* MG1655-*lysP211* in Minimalmedium in Gegenwart von Lysin ergab ein ähnliches Bild wie beim Wildtyp. Die Transkription des *cadBA*-Operons begann sofort, ein Maximum an *cadBA*-mRNA konnte jedoch bereits nach 15 min detektiert werden, wobei die Induktion der Transkription (bezogen auf den Zeitpunkt $t_{.30}$) letztendlich um einen Faktor $\sim 1,8$ höher war als beim Wildtyp. Somit begann die Transkription früher als im Wildtyp, was durch das Fehlen des Repressors LysP bedingt war, und es wurde deutlich mehr *cadBA*-mRNA gebildet. Zusätzlich verlief das Abschalten der Transkription langsamer als im Wildtyp, erst nach 150 min wurde kein *cadBA*-Transkript mehr detektiert.

Gleichzeitig mit der höheren Transkription war auch die spezifische CadA-Aktivität um den Faktor 1,5 höher. Eine Derepression der Lysin-Decarboxylase in einigen *lysP*-Mutanten wurde bereits 1980 bei Popkin und Maas beschrieben. Auch wurde in MG1655-*lysP211* zu den Zeitpunkten $t_{.30}$ und t_0 bereits eine geringe spezifische CadA-Aktivität gemessen, was auch bei anderen *lysP*-Mutanten festgestellt wurde (Neely *et al.*, 1994). Der Grund hierfür ist

wahrscheinlich die fehlende Inaktivierung von CadC durch LysP unter nicht-induzierenden Bedingungen.

Als Folge der erhöhten relativen CadA-Menge war auch die maximale Konzentration an extrazellulärem Cadaverin um den Faktor 1,5 erhöht, es wurden am Ende des Experiments ca. 9 mM Cadaverin im Kulturüberstand gemessen.

Fehlte während des Wachstums der Induktor Lysin, so begann dennoch bereits wenige Minuten nach der Induktion die Transkription von *cadBA*, jedoch mit Zeitverzögerung im Vergleich zum Experiment mit Lysin. Auch die maximale Induktion war geringer (ca. 77fach), änderte sich jedoch kaum noch zwischen 30 und 60 min. Dann wurde die Transkriptmenge weniger, nach 150 min war kaum mehr *cadBA*-mRNA nachweisbar. Durch das Fehlen von LysP wurde der Lysin-Bedarf für die Induktion des Cad-Systems somit vollständig eliminiert.

Möglicherweise als Folge der verlängerten *cadBA*-Expression war die spezifische CadA-Aktivität um einen Faktor ~ 2 höher als bei Wachstum in Gegenwart von 10 mM Lysin.

Die Messung von extrazellulärem Cadaverin erwies sich als schwierig, da aufgrund des fehlenden exogenen Lysins keine hohen Cadaverin-Konzentrationen zu erwarten waren und das Testsystem (Derivatisierung von Cadaverin mit TNBS) wenig sensitiv war. Dennoch konnte eine mit TNBS-derivatisierte Substanz nach Überführen der Zellen zu induzierenden Bedingungen im Kulturüberstand detektiert werden, ob es sich hierbei tatsächlich um Cadaverin handelte, kann nicht eindeutig gesagt werden. Man kann jedoch vermuten, dass in MG1655-*lysP211* auch endogenes Lysin decarboxyliert werden konnte, da die Lysin-Decarboxylase ja in großer Menge vorhanden war. Des Weiteren muss beachtet werden, dass in *E. coli* eine zweite Lysin-Decarboxylase existiert. So konnte in früheren Arbeiten auch bei pH 9 Lysin-Decarboxylase-Aktivität gemessen werden (Morris und Fillingame, 1974). Goldemberg beschrieb eine induzierbare, thermostabile Lysin-Decarboxylase und eine konstitutive, in kleinen Mengen vorhandene und thermolabile Lysin-Decarboxylase (Goldemberg, 1980), spätere Arbeiten bestätigten das Vorhandensein einer weiteren Lysin-Decarboxylase, welche Ldc genannt wurde (Kikuchi *et al.*, 1997; Lemmonier und Lane, 1998).

Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch ohne das Vorhandensein von exogenem Lysin geringe Konzentrationen an Cadaverin im Medium vorhanden waren, jedoch sollte hier keine Induktion der Synthese durch Überführen der Zellen zu induzierenden Bedingungen stattfinden (vgl. Abb. 7D).

Es stellt sich auch die Frage, ob im Kulturüberstand überhaupt genug Cadaverin vorhanden war, um die *cadBA*-Transkription zu beenden. So könnte die verlängerte Expression mit einer zu niedrigen Cadaverin-Konzentration erklärt werden, jedoch ist unklar, warum die Transkription dann nach 150 min trotzdem beendet wurde. Dies könnte jedoch damit begründet werden, dass zu diesem Zeitpunkt einige Zellen bereits lysiert waren und somit Lysin im extrazellulären Raum zur Verfügung stellten, das von anderen Zellen decarboxyliert werden konnte. Da bereits geringe Konzentrationen von Cadaverin die *cadBA*-Expression inhibieren, wäre dies durchaus denkbar. Durch das Fehlen eines Säurestress-Systems in *MG1655-lysP211* könnten aber auch andere Sigma-Faktoren gebildet werden und das σ^{70} -abhängige Cad-System würde dann abgeschaltet werden. Das Abschalten der Transkription könnte aber auch einfach durch den *Turn-Over* der mRNA bedingt sein.

4.1.3 RavA und/oder ViaA aktivieren die *cadBA*-Expression

Die Transkriptionsanalyse des Cad-Systems in einer *ravA/viaA*-Mutante zeigte, dass die Expression des *cadBA*-Operons zwar ähnlich reguliert wurde wie in *E. coli* MG1655, d. h. die Induktion erfolgte durch einen niedrigen pH-Wert und das Vorhandensein von Lysin, jedoch war die detektierte Menge an *cadBA*-mRNA nur ca. 69% im Vergleich zum Wildtyp. Ähnliches bestätigte die zeitabhängige Transkriptionsanalyse. Zwar war, wie im Wildtyp, eine transiente *cadBA*-Expression nachweisbar, die sofort nach der Induktion begann, jedoch war die maximale Induktion der Transkription in der Mutante deutlich niedriger (ca. 30fache Induktion im Vergleich zu t_{30}). Als Folge dessen waren auch die maximal gemessene spezifische CadA-Aktivität sowie die extrazelluläre Cadaverin-Konzentration niedriger als im Wildtyp.

Welche Rolle RavA und/oder ViaA bei der Aktivierung der Transkription spielen ist jedoch unklar. RavA ist eine AAA⁺-ATPase, die zusammen mit CadA einen großen Komplex bildet. Es konnte gezeigt werden, dass durch diese Komplexbildung die ATPase-Aktivität von RavA stimuliert wurde, die CadA-Aktivität wurde jedoch dadurch nicht beeinflusst (Snider *et al.*, 2006). AAA⁺-ATPasen sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, z. B. bei Proteinfaltung bzw. Abbau von Proteinen, Regulation der Transkription, Reparatur und Replikation von DNA, oder auch bei der Biogenese von Organellen und bei Transportvorgängen (Neuwald *et al.*, 1999; Iyer *et al.*, 2004). Diese Proteine besitzen das sog. AAA⁺-Modul, ein Bereich aus 200 bis 250 Aminosäuren mit verschiedenen konservierten Motiven (Neuwald *et al.*, 1999; Kunau *et al.*, 1993; Patel und Latterich, 1998), das für ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse verantwortlich ist (Ogura und Wilkinson, 2001). RavA (*regulatory*

ATPase variant A) gehört zur Unterfamilie der MoxR-Proteine (Iyer *et al.*, 2004). Gene, die für MoxR-Proteine kodieren, liegen oft in einem Operon mit Genen, die für Proteine mit der sog. VWA-Domäne (Von Willebrand Faktor Typ A) kodieren. Die VWA-Domäne ist eine Metall-bindende Domäne, die bei Pro- und Eukaryoten vorkommt. Sie vermittelt häufig Protein/Protein-Interaktionen, oder spielt eine Rolle bei z. B. Zell-Adhäsion, Transkription oder DNA-Reparatur (Whittaker und Hynes, 2002). Snider *et al.* beschrieben 2006 *viaA* (VWA interacting with AAA⁺ ATPase), das zusammen mit *ravA* in einem Operon liegt und für ein Protein mit einer VWA-Domäne kodiert. Aufgrund der vielfältigen Funktionen von RavA bzw. ViaA kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Proteine Transkriptionsaktivatoren des *cadBA*-Operons sind, jedoch konnten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Gelretardationsexperimente mit gereinigtem RavA bzw. ViaA keine Bindung an die DNA-Region, in der CadC bindet, nachweisen. Des Weiteren wurde eine allgemeine Funktion von RavA in der Stressantwort angenommen, da die Expression unter der Kontrolle des σ^S -Faktors steht und die RavA-Menge in der frühen stationären Phase zunimmt (Snider *et al.*, 2006). Außerdem wurde eine Chaperon-Funktion von AAA⁺-ATPasen aus der MoxR-Familie zusammen mit VWA-Domäne-Proteinen vorgeschlagen (Snider und Houry, 2006). Möglicherweise ist die Rolle von RavA und/oder ViaA eine Stabilisierung von CadC, ähnlich wie ToxS eine Stabilisierung von ToxR bewirkt (DiRita und Mekalanos, 1991; Pfau und Taylor, 1998), auch eine bessere Bindung von CadC an den Promotor P_{Cad} durch RavA und/oder ViaA wäre denkbar.

4.1.4 Mathematische Modellierung des Cad-Systems

Zunächst wurden die für *E. coli* MG1655 bestimmten Daten quantitativ beschrieben. Hierbei wurde die Integration der extrazellulären Reize pH-Wert, Lysin und Cadaverin durch CadC, die Dynamik der Genexpression und die Umsetzung von Lysin zu Cadaverin berücksichtigt. Das Modell ging von verschiedenen CadC-Populationen aus: bei nicht-induzierenden Bedingungen ist CadC inaktiv, in Gegenwart eines niedrigen pH-Werts und bei Anwesenheit von Lysin wird der reprimierende Effekt durch LysP aufgehoben und CadC ist voll aktiv (CadC*). CadC* bindet an die DNA und aktiviert dadurch die Expression des *cadBA*-Operons (Fritz *et al.*, Manuskript in Vorbereitung; Abb. 37).

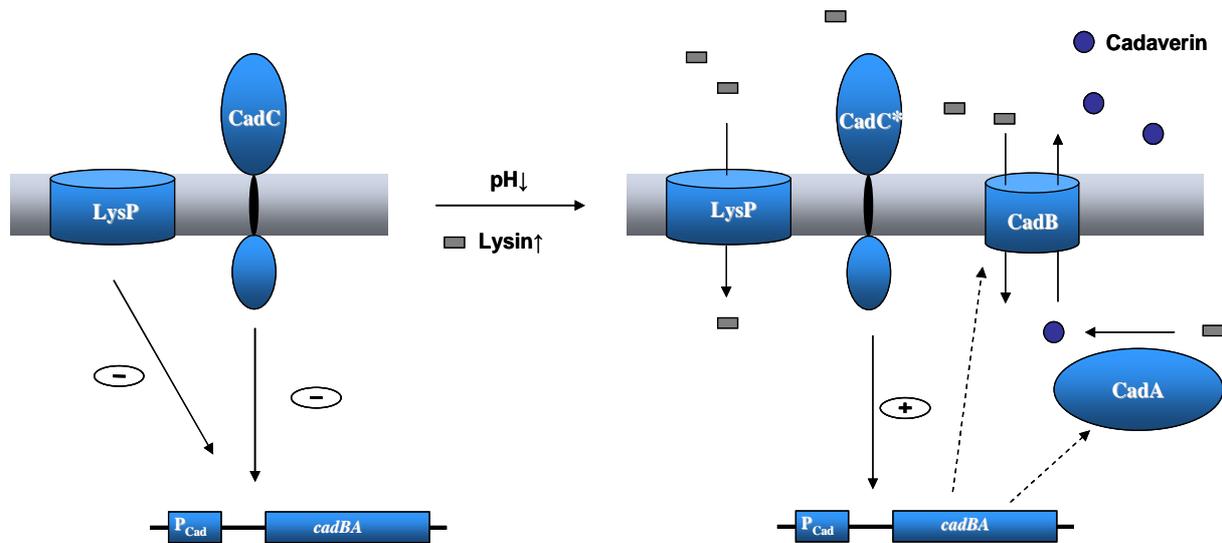


Abb. 37: Darstellung der durch das *in silico* Modell beschriebenen Induktion des Cad-Systems in *E. coli*

Unter nicht-induzierenden Bedingungen reprimiert LysP die *cadBA*-Expression. Sind die Signale niedriger pH-Wert und Lysin vorhanden, wird der reprimierende Effekt von LysP aufgehoben und CadC geht in einen aktiven Zustand über (CadC*). CadC* aktiviert die Expression von *cadBA*, dadurch werden CadA und CadB synthetisiert. Das bei der Decarboxylierung durch CadA entstehende Cadaverin wird von CadB nach außen transportiert und hemmt die *cadBA*-Expression.

Das quantitative Modell beschrieb den raschen Anstieg und das schnelle Abschalten der *cadBA*-Transkription aufgrund der steigenden Konzentration an extrazellulärem Cadaverin, bedingt durch die Decarboxylierung von Lysin durch CadA und den nachfolgenden Export von Cadaverin durch den Antiporter CadB. Die Antiport-Funktion dieses Proteins bietet den Vorteil, dass das Cad-System nicht mit dem endogenen Lysin-Stoffwechsel der Zelle interferiert. Da die CadB-Aktivität von der extrazellulären Lysin-Konzentration und der intrazellulären Cadaverin-Konzentration abhängt, besteht jedoch die Gefahr eines permanenten Lysin-Imports und Cadaverin-Exports durch CadB. Um dies zu verhindern, wird Cadaverin als negativer Regulator der *cadBA*-Expression verwendet, so dass diese nur transient erfolgt.

Eine schnelle Reaktion auf Umweltbedingungen durch eine transient veränderte Genexpression spielt eine wichtige Rolle in Mikroorganismen. Eine kürzlich durchgeführte Transkriptomanalyse untersuchte z. B. die Veränderung der Genexpression anaerob wachsender *E. coli*-Zellen nach Zufuhr von Luft. Innerhalb von 10 min nach Luftzufuhr war das Profil der Transkription komplett verändert. Wie erwartet wurden v. a. Gene der Glycolyse, des Citrat-Zyklus, der Atmungskette und der oxidativen Stressantwort induziert

(Partridge *et al.*, 2006). Im Unterschied zur Expression des *cadBA*-Operons war das Expressionslevel der meisten Gene jedoch über einen Zeitraum von 60 min ungefähr konstant, Ausnahmen waren hier nur Gene, die für die Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase kodieren, oder auch *grxA* (kodiert für Glutaredoxin1) und *trxC* (kodiert für Thioredoxin C), deren Expression bereits nach 10 min wieder abnahm.

Ein weiteres Beispiel ist die Hitzeschockantwort in *L. monocytogenes* (van der Veen *et al.*, 2007). Die Gruppe um van der Veen kultivierte die Zellen zunächst bei 37°C (Zeitpunkt 0) und setzte diese dann einer Temperatur von 48°C aus. Transkriptionsanalysen mit DNA-Chips ergaben bereits wenige Minuten nach Induktion eine deutlich veränderte Genexpression bei 25% aller Gene, 40 min nach Induktion war das Expressionsniveau der meisten Gene jedoch wieder ähnlich wie beim Zeitpunkt 0. So wurde beispielsweise bereits 3 min nach der Induktion eine 29fach erhöhte *clpE*-Transkriptmenge (kodiert für die ATP-abhängige Protease ClpE) detektiert, die jedoch rasch wieder abnahm. Nach 10 min war die Transkriptmenge nur noch ~ 3 fach erhöht und blieb im Verlauf des Experiments auf diesem Level.

Das quantitative Modell konnte ebenfalls die Zunahme der relativen Menge an CadA und die Stabilität des Enzyms im weiteren Verlauf des Experiments beschreiben, da von einer geringen Degradation ausgegangen wurde, auch der kontinuierliche Anstieg der extrazellulären Cadaverin-Konzentration konnte gut modelliert werden.

In einem nächsten Schritt wurde die Dynamik des Cad-Systems in *E. coli* MG1655-*lysP211* berechnet. Das Modell wurde mit den gleichen Parametern integriert wie das Wildtyp-Modell. Da hier der Repressor LysP nicht anwesend war, wurde angenommen, dass bereits zum Zeitpunkt t_0 eine maximale Menge an aktivem CadC (CadC*) vorhanden war. Dies resultierte in einem schnelleren Anschalten der *cadBA*-Transkription und einer höheren Transkriptionsrate, als Folge dessen war die relative CadA-Menge höher, ebenso die extrazelluläre Cadaverin-Konzentration. Die *in silico* berechneten Daten ergaben eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentell erhaltenen Daten. Die Experimente ohne Lysin zeigten, dass durch das Fehlen von LysP der Lysin-Bedarf für die Induktion des Cad-Systems vollständig eliminiert wurde (Abb. 38).

Die Rolle von RavA und/oder ViaA ist noch ungeklärt, es könnte zum einen die Transkription von *cadBA* verstärkt oder die Expression von *cadC* erhöht werden, aber auch eine Stabilisierung der *cadBA*-mRNA wäre denkbar, konnte aber mathematisch ausgeschlossen werden, da hier eine schnellere RNA-Dynamik zu erwarten gewesen wäre als experimentell

gemessen wurde. Am wahrscheinlichsten ist eine Rolle in der Verstärkung der Transkription, hier passte das errechnete Modell sehr gut zu den experimentell bestimmten Daten (Abb. 38). Das Fehlen von RavA bzw. ViaA in *E. coli* MG1655 Δ ravA führte zu einer verringerten Expression des *cadBA*-Operons und somit allgemein zu einer erniedrigten Aktivität des Cad-Systems, was sich sowohl in der niedrigen relativen CadA-Menge als auch einer verringerten Cadaverin-Exkretion widerspiegelte.

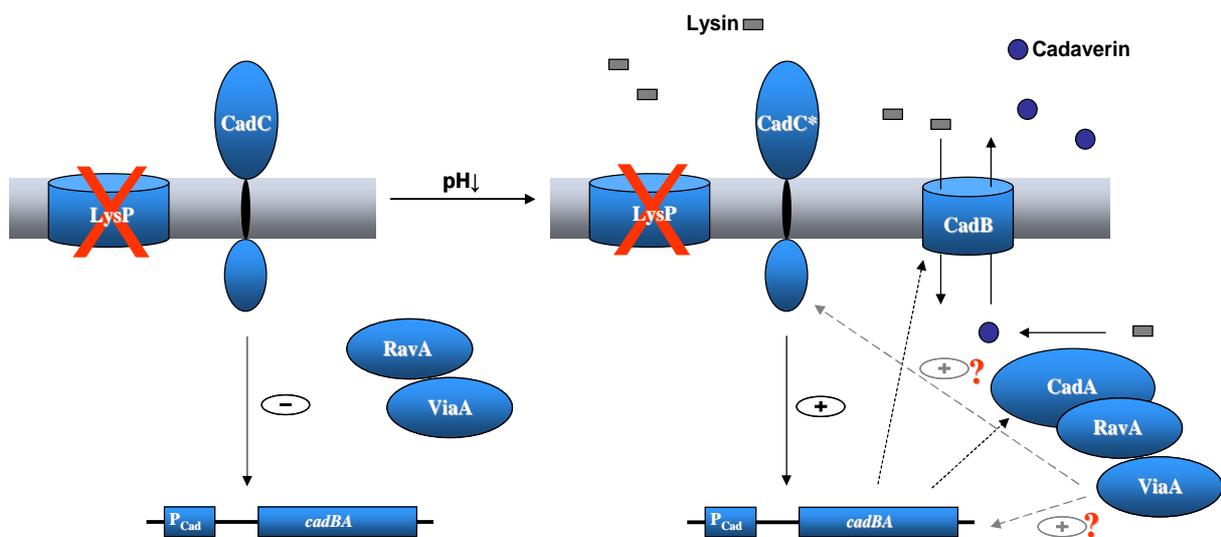


Abb. 38: *in silico* Modell der Rolle von LysP und RavA/ViaA

Durch das Fehlen des Repressors LysP ist Lysin für die Induktion des Cad-Systems nicht mehr nötig, deshalb reicht ein niedriger pH-Wert aus, um CadC in einen aktiven Zustand zu überführen (CadC*). RavA und/oder ViaA verstärken die *cadBA*-Expression. Die Details zur Abbildung sind im Text erklärt.

Die quantitative Beschreibung des Cad-Systems von *E. coli* MG1655-*lysP211* und *E. coli* MG1655 Δ ravA ergab somit eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Daten, und macht den Nutzen der mathematischen Modellierung für das Verständnis komplexer zellulärer Vorgänge deutlich. Analog zum Cad-System könnten z. B. auch die anderen Säure-induzierbaren Decarboxylase-Systeme von *E. coli* modelliert und somit die komplexe Säureschutzantwort von *E. coli* in seiner natürlichen Umgebung besser verstanden werden.

4.2 Reizwahrnehmung durch CadC

CadC gehört zur Familie der ToxR-ähnlichen Transkriptionsaktivatoren und besteht aus 3 Domänen, einer N-terminalen, cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer C-terminalen, periplasmatischen Domäne. CadC wurde in früheren Arbeiten als Sensor für Lysin, einen niedrigen pH-Wert und Cadaverin vorgeschlagen. Um zu prüfen, ob CadC tatsächlich ein Lysin-Sensor ist, wurden in der vorgelegten Arbeit mit dem gereinigten Protein (CadC und die periplasmatische Domäne CadC188-512) *in vitro* Affinitätsstudien durchgeführt und der Einfluss der Lysin-Konzentration auf die *cadBA*-Expression *in vivo* analysiert. Zusätzlich wurde die Affinität der periplasmatischen Domäne von CadC für den negativen Regulator Cadaverin charakterisiert.

4.2.1 CadC weist nur eine niedrige Affinität für Lysin auf

Um die Affinität der gereinigten periplasmatischen Domäne von CadC (CadC188-512) für Lysin zu untersuchen, wurde die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512 analysiert. Mit dieser Methode können Konformationsänderungen eines Proteins, z. B. nach Bindung eines Liganden, detektiert werden. CadC188-512 enthält vier Tryptophane, die über die gesamte periplasmatische Domäne verteilt vorliegen (W211, W318, W450, W488), eine Bindung von Lysin könnte somit zu einer Veränderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz führen. Mit Hilfe dieser Methode wurden beispielsweise Zucker-induzierte Konformationsänderungen der Melibiose-Permease in *E. coli* detektiert (Mus-Veteau *et al.*, 1995). Auch die Affinität von OpuAC für Glycinbetain und Prolinbetain in *Bacillus subtilis* (Horn *et al.*, 2005) oder auch die Affinität von CaiT für L-Carnitin in *E. coli* (Jung *et al.*, 2002) wurden mit Hilfe von Tryptophanfluoreszenz-Messungen bestimmt.

Wurde Lysin aus einer konzentrierten Lösung schrittweise zu CadC188-512 titriert, so war zwar ein Einfluss auf die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von CadC188-512 zu erkennen, jedoch war der K_D -Wert mit 2,29 mM relativ hoch. Der K_D -Wert ist ein Maß für die Affinität eines Proteins zum Ligand. Je höher dieser Wert ist, desto geringer ist die Affinität. So beträgt dieser z. B. bei der Citrat-Bindung durch CitA in *Klebsiella pneumoniae* ~ 5 μ M (Kaspar *et al.*, 1999), oder bei der Bindung von Glycinbetain durch OpuAC 17 μ M (Horn *et al.*, 2006), deshalb indizierte der in der vorliegenden Arbeit ermittelte K_D -Wert eine sehr niedrige Affinität von CadC188-512 für Lysin. Es muss auch darauf hingewiesen werden, dass die Darstellung der Daten als Scatchard-Plot keine richtige Gerade ergab (siehe Abb. 14B), so dass der ermittelte K_D -Wert relativ ungenau ist.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass ein niedriger pH-Wert Voraussetzung war für die Bindung von Lysin, wurden die Versuche auch bei pH 5,8 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurden jedoch nur unspezifische Veränderungen der Tryptophanfluoreszenz detektiert und ein K_D -Wert konnte nicht ermittelt werden. Eine Lysin-Wahrnehmung durch die periplasmatische Domäne von CadC ist somit unwahrscheinlich.

In früheren Arbeiten wurde eine durch das Derivat CadC-R265C-vermittelte Lysin-unabhängige *cadBA*-Expression beschrieben. Als Erklärung wurde eine erhöhte Lysin-Affinität, aufgrund einer veränderten Konformation dieses Derivats, vorgeschlagen (Dell *et al.*, 1994). Jedoch betrug der mit Hilfe von Tryptophanfluoreszenz-Messungen gemessene K_D -Wert von CadC188-512-R265C für Lysin nur 3,41 mM, diese niedrige Affinität spricht somit gegen die von Dell *et al.* aufgestellte Hypothese. Interessanterweise wurde die *cadBA*-Expression wieder Lysin-abhängig aktiviert, wenn R265 gegen die Aminosäuren Lysin, Serin oder Glutamin ausgetauscht wurde (Tetsch *et al.*, 2008). Der Argininrest an Position 265 spielt somit keine Rolle in der Lysin-Wahrnehmung, vielmehr schien die Substitution mit Cystein zu weitreichenden Veränderungen in der Konformation von CadC zu führen, möglicherweise durch das Ausbilden von Disulfidbrücken mit den nativen Cysteinen von CadC. Die von Dell *et al.* beschriebene Lysin-unabhängige *cadBA*-Expression lässt sich vermutlich auf eine gestörte Interaktion des Derivats CadC-R265C mit LysP zurückführen.

Um auszuschließen, dass die niedrige Affinität für Lysin die Folge einer unvollständig gefalteten periplasmatischen Domäne war, wurden weitere Affinitätsbestimmungen mit dem gesamten CadC durchgeführt. Dazu wurde die Methode der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC) angewendet. Mit Hilfe von ITC-Messungen können direkt Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand, Protein und DNA oder auch Protein und Protein detektiert werden. Während sich bei der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz verschiedene Effekte in ihrer Wirkung aufheben können und somit nicht immer detektierbar sind, wird bei ITC-Messungen direkt der Verbrauch oder die Entstehung von Wärmeenergie bei der Bindung von Liganden detektiert. Mit Hilfe der ITC können durch ein einziges Experiment verschiedene Parameter, wie z. B. die Assoziationskonstante K_A , die Stöchiometrie der Bindung und die Enthalpie der Bindung ermittelt werden. Anhand der Assoziationskonstante können die freie Energie und die Entropie bestimmt werden (Wiseman *et al.*, 1989). Mit Hilfe dieser Methode wurde z. B. die Bindung von Serin an den Serin-Rezeptor Tsr von *E. coli* untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass ein Serin-Molekül an ein Tsr-Dimer bindet, die Assoziationskonstante K_A betrug $3,5 - 4,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, abhängig davon ob das Protein solubilisiert oder in Membranen vorlag (Lin *et al.*, 1994). Auch die

Bindung von Citrat an die periplasmatische Domäne von CitA von *E. coli* wurde mit Hilfe von ITC gezeigt, der K_D -Wert betrug $0,3 \mu\text{M}$ (Kaspar und Bott, 2002). Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass bei einer niedrigen Affinität für den Ligand sehr viel Protein benötigt wird. Bei den oben genannten Beispielen war die Affinität der Proteine zu den Liganden sehr hoch, die K_D -Werte befanden sich im μM -Bereich.

Die schrittweise Titration von Lysin zu solubilisiertem CadC führte zwar zu exothermen Signalen, die nicht auf die Verdünnungswärme zurückzuführen waren, die Integration dieser Daten ergab jedoch keine sigmoide Kurve, wie sie für eine spezifische Bindung typisch wäre. Der dennoch berechnete K_D -Wert wurde als $22,5 \text{ mM}$ angegeben und bestätigte somit die bereits durch die Tryptophanfluoreszenz-Messungen gezeigte niedrige Affinität für Lysin. Für eine genaue Berechnung des K_D -Werts hätte wesentlich mehr Protein eingesetzt werden müssen als $16 \mu\text{M}$, jedoch konnte CadC nicht in ausreichenden Mengen erhalten werden, um zuverlässige Messdaten zu erhalten. Weitere Experimente mit z. B. rekonstituiertem CadC (bei pH 5,8 und pH 7,6) bzw. mit in Membranvesikeln von *E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET16b-cadC überproduziertem CadC lieferten ebenfalls keinen Hinweis auf eine Affinität von CadC für Lysin.

4.2.2 Einfluss der Lysin-Konzentration auf die *cadBA*-Expression *in vivo*

Da die Lysin-Affinität von CadC *in vitro* sehr niedrig war, wurde der Einfluss von höheren Lysin-Konzentrationen auf das Cad-System *in vivo* untersucht. Als Maß für die *cadBA*-Expression wurde die spezifische CadA-Aktivität von MG1655 (Wildtyp) in zellfreien Extrakten bestimmt, wenn 100 bis 250 mM Lysin im Wachstumsmedium (pH 5,8) waren. Es zeigte sich, dass steigende Lysin-Konzentrationen jedoch keine Erhöhung der *cadBA*-Expression bewirkten, sobald 10 mM Lysin im Medium vorhanden waren, war das System voll induziert und konnte auch durch hohe Lysin-Konzentrationen nicht mehr gesteigert werden. Dies bedeutet, dass bei pH 5,8 und dem Vorhandensein einer bestimmten Lysin-Konzentration der reprimierende Effekt von LysP aufgehoben wird und dann keine Rolle mehr spielt. Wurde jedoch gleichzeitig LysP überproduziert, so wurde die *cadBA*-Expression um $\sim 88\%$ reduziert, wenn 10 mM Lysin im Medium waren, doch steigende Lysin-Konzentrationen erhöhten hier die *cadBA*-Expression. Waren 100 mM Lysin vorhanden, wurden im Vergleich zu MG1655 (ohne LysP-Überproduktion) immerhin 44% der spezifischen CadA-Aktivität gemessen. Somit schien eine hohe Lysin-Konzentration den reprimierenden Effekt von LysP zum Teil wieder aufzuheben. Eine Erklärung hierfür wäre

beispielsweise eine Hemmung der *lysP*-Transkription durch Lysin, wie sie bereits früher gezeigt werden konnte (Neely und Olson, 1996).

Die in Kapitel 4.2.1 diskutierte niedrige Affinität von CadC für Lysin und die Tatsache, dass auch hohe Lysin-Konzentrationen die *cadBA*-Expression in *E. coli* MG1655 (Wildtyp) nicht verstärken konnten, schließen eine direkte Wahrnehmung von Lysin durch CadC aus.

4.2.3 Die periplasmatische Domäne von CadC ist ein Cadaverin-Sensor

Neely *et al.* untersuchten 1994 mittels *in vivo* Experimenten die negative Rückkopplung von Cadaverin auf die *cadBA*-Expression. Sie analysierten den Effekt von steigenden Cadaverin-Konzentrationen auf eine *cadA-lacZ*-Fusion und zeigten, dass bereits ab 20 μM die Expression von *cadA-lacZ* reduziert wurde, 1,3 mM Cadaverin inhibierten die Expression vollständig. Auf das CadC-Derivat CadC-R265C war der Einfluss von Cadaverin deutlich niedriger (Reduktion auf ca. 69% der Ausgangsaktivität; Neely *et al.*, 1994). Dies indizierte eine Interaktion zwischen der periplasmatischen Domäne von CadC und Cadaverin. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz eine Affinität der periplasmatischen Domäne zu Cadaverin *in vitro* bestätigt werden. Steigende Cadaverin-Konzentrationen verringerten die Fluoreszenz um ca. 20%, diese Effekte unterschieden sich deutlich von unspezifischen Effekten, welche z. B. durch Spermidin oder Puffer ohne Ligand erhalten wurden. Spermidin wurde gewählt, da es *in vivo* keinen Einfluss auf die *cadBA*-Expression aufwies (Neely *et al.*, 1994) und somit eine geeignete Negativkontrolle war. Nach Abzug der unspezifischen Effekte und Auftragung der Werte als $\Delta F/F$ gegen die Cadaverin-Konzentration ergab sich eine typische Sättigungskurve, die eine spezifische Bindung von Cadaverin indizierte. Der K_D -Wert betrug 96 μM und liegt damit im Bereich von z. B. TorT, ein periplasmatisches Bindeprotein, das Trimethylamin-N-oxid bindet, welches unter anaeroben Bedingungen in *E. coli* als terminaler Elektronen-Akzeptor verwendet werden kann ($K_D = 150 \mu\text{M}$, Baraquet *et al.*, 2006).

Der K_D -Wert für die Bindung von Cadaverin an CadC188-512-R265C betrug nur 293 μM , somit war die Affinität dieses Derivats um einen Faktor von 3,1 geringer als bei CadC188-512. Dies erklärt den von Neely *et al.* (1994) beschriebenen verminderten Einfluss von Cadaverin auf dieses Derivat.

Auch mittels *in vivo* Experimenten wurde bestätigt, dass die periplasmatische Domäne von CadC für die negative Regulation durch Cadaverin nötig ist. Während 1,3 mM Cadaverin zu einer Reduktion der *cadBA*-Expression in *E. coli* EP314-pBAD24-*cadC* auf ca. 16% der Ausgangsaktivität führte, hatte es in *E. coli* EP314-pBAD24-*cadC1-215* (Fehlen der

periplasmatischen Domäne von CadC) nur einen geringfügigen Einfluss auf die *cadBA*-Expression (Reduktion der *cadBA*-Expression um 8%).

Die negative Regulation des Cad-Systems beruht somit auf einer Bindung von Cadaverin an die periplasmatische Domäne von CadC. Diese Interaktion mit Cadaverin könnte zu einer veränderten Konformation von CadC führen und es dadurch inaktivieren.

4.3 Interaktion von CadC mit der Lysin-spezifischen Permease LysP

LysP ist der negative Regulator der *cadBA*-Expression unter nicht-induzierenden Bedingungen (Neely *et al.*, 1994). Die Gruppe um Neely schlug vor, dass CadC entweder selbst Lysin sensiert und deshalb mit LysP um das gemeinsame Substrat Lysin konkurriert, oder dass LysP und CadC direkt miteinander interagieren und somit CadC in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Die unter 4.2 diskutierten Ergebnisse zeigen, dass CadC kein Lysin-Sensor ist, deshalb war anzunehmen, dass die Lysin-Abhängigkeit der *cadBA*-Expression auf einer Interaktion von CadC mit LysP beruht.

4.3.1 Interaktion von LysP mit CadC und CadC1-215

Um eine Interaktion zwischen CadC und LysP zu bestätigen, wurde die Repression der *cadBA*-Expression durch LysP *in vivo* charakterisiert, wobei besonders die Rolle der periplasmatischen Domäne von CadC von Interesse war. Durch die Co-Transformation des *lysP*- und *cadC*-negativen Stammes *E. coli* MG1655 Δ *cadC/lysP242* mit den Plasmiden pBAD24-*cadC* und pBAD33-*lysP* wurde die *cadBA*-Expression in diesem Stamm auf 41% im Vergleich zur Expression bei Abwesenheit von LysP reduziert. Um die Bedeutung der periplasmatischen Domäne von CadC bei einer Interaktion zu analysieren, wurde *E. coli* MG1655 Δ *cadC/lysP242* mit pBAD24-*cadC1-215* und pBAD33-*lysP* co-transformiert. Das Plasmid pBAD24-*cadC1-215* kodiert für ein CadC mit einer stark verkürzten periplasmatischen Domäne. Trotz der fehlenden C-terminalen Domäne von CadC wurde die *cadBA*-Expression jedoch deutlich durch LysP reduziert (auf 18% der Expression im Vergleich zur Expression bei Abwesenheit von LysP).

Man muss jedoch beachten, dass CadC, CadC1-215 und LysP für diese Experimente mit Hilfe eines Arabinose-induzierbaren Promotors überproduziert werden mussten, da CadC1-215 ansonsten nicht die *cadBA*-Expression aktivieren kann (Küper, 2005). Dies könnte an einer verminderten Stabilität dieses verkürzten Proteins liegen. Auch für ToxR wurde eine verringerte Stabilität durch Mutationen in der periplasmatischen Domäne beschrieben (Pfau

und Taylor, 1998). Die Western Blot-Analyse ergab jedoch, dass ungefähr gleiche Mengen an CadC und LysP bzw. CadC1-215 und LysP gebildet wurden, so dass Effekte aufgrund unterschiedlicher Proteinmengen ausgeschlossen werden konnten.

Da eine hohe *cadC*-Kopienzahl zu einer Signal-unabhängigen Aktivierung der *cadBA*-Expression führt (Küper, 2005), war CadC durch die Überproduktion konstitutiv aktiv, dennoch war ein Effekt durch LysP auf die *cadBA*-Expression zu verzeichnen. Dieses Resultat indiziert eine Interaktion beider Proteine, jedoch kann eine Beteiligung der periplasmatischen Domäne bei einer Interaktion mit LysP ausgeschlossen werden. Wurde LysP in Gegenwart eines CadC_ToxR-Hybridproteins, das anstelle der periplasmatischen Domäne von CadC die periplasmatische Domäne von ToxR aufwies, überproduziert, so wurde ebenfalls die *cadBA*-Expression inhibiert (Tetsch *et al.*, 2008). Dies bestätigt, dass die periplasmatische Domäne von CadC nicht direkt an einer Interaktion mit LysP beteiligt ist.

Bereits beschriebene Aminosäuresubstitutionen in der periplasmatischen Domäne von CadC, die in einer Lysin-unabhängigen *cadBA*-Expression resultierten (Dell *et al.*, 1994; Neely *et al.*, 1994; Kapitel 3.4.2.4, diese Arbeit) schienen sich indirekt auf diese Interaktion auszuwirken, wahrscheinlich über weitreichende konformationelle Veränderungen in CadC.

4.3.2 *in vitro* Versuche zur Interaktion von CadC und LysP

Die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vivo* Experimente machen eine direkte Interaktion zwischen CadC und LysP unter nicht-induzierenden Bedingungen sehr wahrscheinlich. Um eine physikalische Interaktion *in vitro* nachzuweisen, wurden Quervernetzungsstudien mit dem chemischen Quervernetzer Disuccinimidylsuberat (DSS) durchgeführt. DSS ist membranpermeabel und kann Proteine, die nahe in der Membran zusammen liegen, miteinander verknüpfen (Spannweite: 11,4 Å). DSS reagiert mit primären Aminogruppen und bildet dabei stabile Amidbindungen aus. Tatsächlich konnten beide Proteine quervernetzt werden. Dies zeigte sich im Auftreten eines hochmolekularen Komplexes (> 200 kDa) im SDS-Gel und dem Verringern der Menge an CadC- und LysP-Monomeren. Als Kontrolle wurden jeweils CadC bzw. LysP separat rekonstituiert. Bei einer unspezifischen Quervernetzung wäre hier das gleiche Ergebnis zu erwarten gewesen, nämlich eine Verringerung der Monomere und die Bildung von hochmolekularen Komplexen. Dies war jedoch nicht der Fall, was zeigt, dass LysP und CadC eine räumliche Nähe in den Phospholipiden hatten und möglicherweise eine gewisse Affinität füreinander aufwiesen. Eine weitere Bestätigung für diese Annahme war die Co-Rekonstitution von CadC mit dem Natrium-Prolin-Symporter PutP (Jung *et al.*, 1998). Hier war nur eine geringfügige

Veränderung in der Monomer-Menge zu verzeichnen, außerdem konnte kein hochmolekularer Komplex, bestehend aus quervernetzten Proteinen, nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass die Vernetzung von CadC und LysP keine verstärkte Aggregation als Folge der Co-Rekonstitution war, sondern macht eine Affinität beider Proteine zueinander wahrscheinlich.

4.3.3. Lysin-Transport und regulatorische Funktion von LysP sind nicht gekoppelt

Die Lysin-spezifische Permease LysP ist zum einen der negative Regulator der *cadBA*-Expression, zum anderen transportiert dieses Protein Lysin in die Zelle. Unklar ist jedoch, wie diese beiden Funktionen miteinander gekoppelt sind. Denkbar wäre eine Konformationsänderung aufgrund des Transports von Lysin, welche die Interaktion mit CadC aufhebt. In bereits beschriebenen *lysP*-Mutanten war Lysin nicht nötig für die Expression des *cadBA*-Operons (Popkin and Maas, 1980; Tabor *et al.*, 1980; Neely *et al.*, 1994; Kapitel 3.1.2 diese Arbeit). Diese Thiosin-resistenten und Lysin-unabhängigen *lysP*-Mutanten wiesen in der Regel größere Insertionen oder Deletionen in *lysP* auf, so dass man davon ausgehen kann, dass LysP weder funktionell (kein Lysin-Transport) noch konformationell (keine Interaktion mit CadC) aktiv war. Anhand der Thiosin-resistenten, und somit Lysin-Transporteingeschränkten Mutante *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S, sollte nun untersucht werden, ob ein eingeschränkter Lysin-Transport immer eine Lysin-unabhängige *cadBA*-Expression zur Folge hat. *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S wies einen Aminosäureaustausch von Glycin nach Serin an Position 153 der Aminosäuresequenz auf. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen *lysP*-Mutanten war in diesem Stamm die *cadBA*-Expression strikt Lysin-abhängig, somit fand zum einen eine Interaktion zwischen CadC und LysP-G153S bei Abwesenheit von Lysin statt, zum anderen wurde das Vorhandensein von Lysin noch durch dieses LysP-Derivat wahrgenommen. Auch die Erhöhung der Kopienzahl von *lysP*-G153S, welche die *cadBA*-Expression deutlich reduzierte, bestätigte eine Interaktion von LysP-G153S mit CadC.

LysP gehört zur Familie von Aminosäuretransportern (basische bzw. aromatische Aminosäuren), die in Pro- und Eukaryoten vorkommen. Anhand von Vergleichen der Aminosäuresequenz ist LysP u. a. sehr ähnlich zur aromatischen Aminosäure-Permease AroP (Chye *et al.*, 1986) und zur Phenylalanin-spezifischen Permease PheP (Pi *et al.*, 1991) aus *E. coli* (Steffes *et al.*, 1992). Die Gruppe um Steffes beschrieb verschiedene Aminosäurereste, die aufgrund ihrer Konserviertheit eine Bedeutung beim Lysin-Transport haben könnten, v. a. mehrere Glutamat- bzw. Aspartatreste, die an der Bindung der ϵ -Aminogruppe und der α -Aminogruppe von Lysin beteiligt sein könnten, und verschiedene Argininreste, welche die Carboxylgruppe von Lysin binden könnten. Ein Beispiel hierfür ist der Aspartat-Rezeptor aus

S. typhimurium, bei dem das Substrat in einer geladenen Tasche gebunden wird, die aus 3 Argininresten besteht (Milburn *et al.*, 1991). Interessanterweise befindet sich die Aminosäuresubstitution in MG1655-*lysP*-G153S in unmittelbarer Nähe von konservierten Glutamatresten, welche sich in der cytoplasmatischen Schleife C2 (Ellis *et al.*, 1995) befinden. Möglicherweise bewirkt das Ersetzen der kleinen, aliphatischen Aminosäure Glycin durch die größere, polare Aminosäure Serin konformationelle Veränderungen in LysP, die den Lysin-Transport verhindern, gleichzeitig bleibt der inhibitorische Effekt auf das Cad-System jedoch bestehen.

Somit ist der Transport von Lysin durch LysP keine Voraussetzung, damit die Interaktion mit CadC aufgelöst wird. Möglicherweise ist bereits die Wahrnehmung von Lysin durch LysP ausreichend, um die Konformation von LysP so zu verändern, dass die Interaktion mit CadC aufgehoben wird.

4.4 Modell der Aktivierung und Inaktivierung des Cad-Systems in *E. coli*

Die in 4.1 bis 4.3 diskutierten Ergebnisse können nun in folgendem Modell zusammengefasst werden (Abb. 39):

Liegen nicht-induzierende Bedingungen vor, also ein neutraler pH-Wert und Abwesenheit von Lysin, interagieren LysP und CadC miteinander, so dass CadC inaktiv ist und die Expression von *cadBA* nicht induzieren kann. Diese Interaktion erfolgt nicht über die periplasmatische Domäne von CadC. Studien mit CadC-Derivaten, die Mutationen in der Transmembrandomäne aufwiesen, schlugen diese als Interaktionspartner für LysP vor, wobei v. a. ein Cluster aus aromatischen Aminosäuren, besonders Phenylalanin an Position 165 von Bedeutung war (Tetsch *et al.*, 2008). Sal-Man *et al.* (2007) konnten die Bedeutung von aromatischen Aminosäuren bei der Homodimerisierung von Transmembrandomänen zeigen. Möglicherweise sind aromatische Aminosäuren auch bei einer Heterodimerisierung von CadC und LysP beteiligt. Alle 12 Transmembrandomänen von LysP haben mindestens eine aromatische Aminosäure, die möglicherweise in Frage käme. Interessanterweise haben die Transmembrandomänen I bis X eine interne Symmetrie, wohingegen die Funktion der letzten beiden Transmembrandomänen unklar ist (Jung *et al.*, 2007), somit wäre eine Interaktion über diese beiden Transmembrandomänen denkbar.

Liegen ein niedriger pH-Wert und eine ausreichende Konzentration an Lysin im Medium vor, so wird die Interaktion zwischen beiden Proteinen gelöst und LysP bindet und transportiert Lysin. Jedoch ist der Lysin-Transport durch LysP nicht unbedingt Voraussetzung für die

Auflösung der Interaktion mit CadC, wie die Versuche mit MG1655-*lysP*-G153S zeigen konnten, die Wahrnehmung von Lysin durch LysP ist offenbar bereits ausreichend. Weiterhin muss erwähnt werden, dass hohe Lysin-Konzentrationen die Expression von *lysP* inhibieren (Neely und Olson, 1996). Dies könnte gewährleisten, dass kein neues LysP mehr synthetisiert wird, und die Lysin-Aufnahme nur noch über die Antiport-Aktivität von CadB erfolgt.

Wie das pH-Signal erkannt wird, ist noch nicht geklärt, aber möglicherweise ist CadC in der Lage, den pH-Wert selbst wahrzunehmen, zumindest indizieren dies die Tatsachen, dass Aminosäureaustausche in der periplasmatischen Domäne eine pH-unabhängige, aber Lysin-abhängige *cadBA*-Expression induzierten (Dell *et al.*, 1994; Dönhöfer, 2007; Haneburger, 2007) und dass *lysP*-Mutanten weiterhin pH-abhängig die *cadBA*-Expression aktivierten (Neely *et al.*, 1994; Kapitel 3.1.2.2, diese Arbeit). Kürzlich durchgeführte Proteolyse-Experimente konnten indirekt zeigen, dass CadC unterschiedliche Konformationen bei pH 7,6 und pH 5,8 einnimmt (Haneburger, 2007). Für LysP wiederum wurde eine deutlich erhöhte Transportaktivität beschrieben, wenn anaerobe Bedingungen, 0,5% Lysin und ein niedriger pH-Wert vorlagen (Steffes *et al.*, 1992), was eine veränderte Konformation dieses Proteins unter diesen Bedingungen indiziert. Dies sind wiederum die gleichen Bedingungen, die auch CadC aktivieren. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Gruppe um Steffes Transportstudien mit ganzen Zellen durchführte. Sie konnte zwar die Lysin-Aufnahme durch das hochaffine LAO-System (Lysin/Arginin/ Ornithin-System; Rosen, 1971a,b) unter diesen Wachstumsbedingungen ausschließen, dennoch wurde die Aufnahme von Lysin durch CadB nicht berücksichtigt. Trotzdem indizieren diese Ergebnisse, dass sowohl CadC als auch LysP in Gegenwart eines niedrigen pH-Wertes eine Konformationsänderung eingehen. Diese Konformationsänderung erfolgt möglicherweise durch das Auflösen einer Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne von CadC. Ein Hinweis hierfür sind CadC-Derivate, bei denen die Cysteinreste C208 bzw. C272 durch Alanin ersetzt wurden, so dass die Ausbildung einer Disulfidbrücke nicht möglich war. Diese Derivate induzierten bei Vorhandensein von Lysin auch bei pH 7,6 die *cadBA*-Expression und repräsentierten somit möglicherweise einen „semi-aktiven“ Zustand von CadC, in dem ein niedriger pH-Wert nicht mehr für die Aktivierung nötig war. Das Vorhandensein von Lysin war nur in Gegenwart eines funktionellen LysP erforderlich, ohne LysP war die Induktion der *cadBA*-Expression pH- und Lysin-unabhängig (Dönhöfer, 2007; zur Rolle der Disulfidbrücke siehe auch Kapitel 4.5.1.1). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Lysin-Abhängigkeit der *cadBA*-Expression von LysP vermittelt wird, während ein niedriger pH-Wert wahrscheinlich von CadC selbst

wahrgenommen wird. Kürzlich konnte Aspartat 471 als essentiell für die pH-Sensorik identifiziert werden (Haneburger, 2007).

Durch die Auflösung der Interaktion mit LysP ist CadC nun voll aktiviert (CadC*) und kann die Expression des *cadBA*-Operons induzieren. Dadurch kommt es zur Synthese von CadA und CadB und zur Decarboxylierung von Lysin durch CadA. Welche Rolle RavA und ViaA bei der Aktivierung der *cadBA*-Expression spielen ist unklar, vorstellbar sind eine Stabilisierung von CadC oder eine Stärkung der Bindung von CadC an P_{Cad} . Die Synthese von RavA/ViaA erfolgt v. a. zu Beginn der stationären Wachstumsphase, so dass eine Funktion als allgemeine Stressproteine ebenfalls denkbar wäre (Snider *et al.*, 2006).

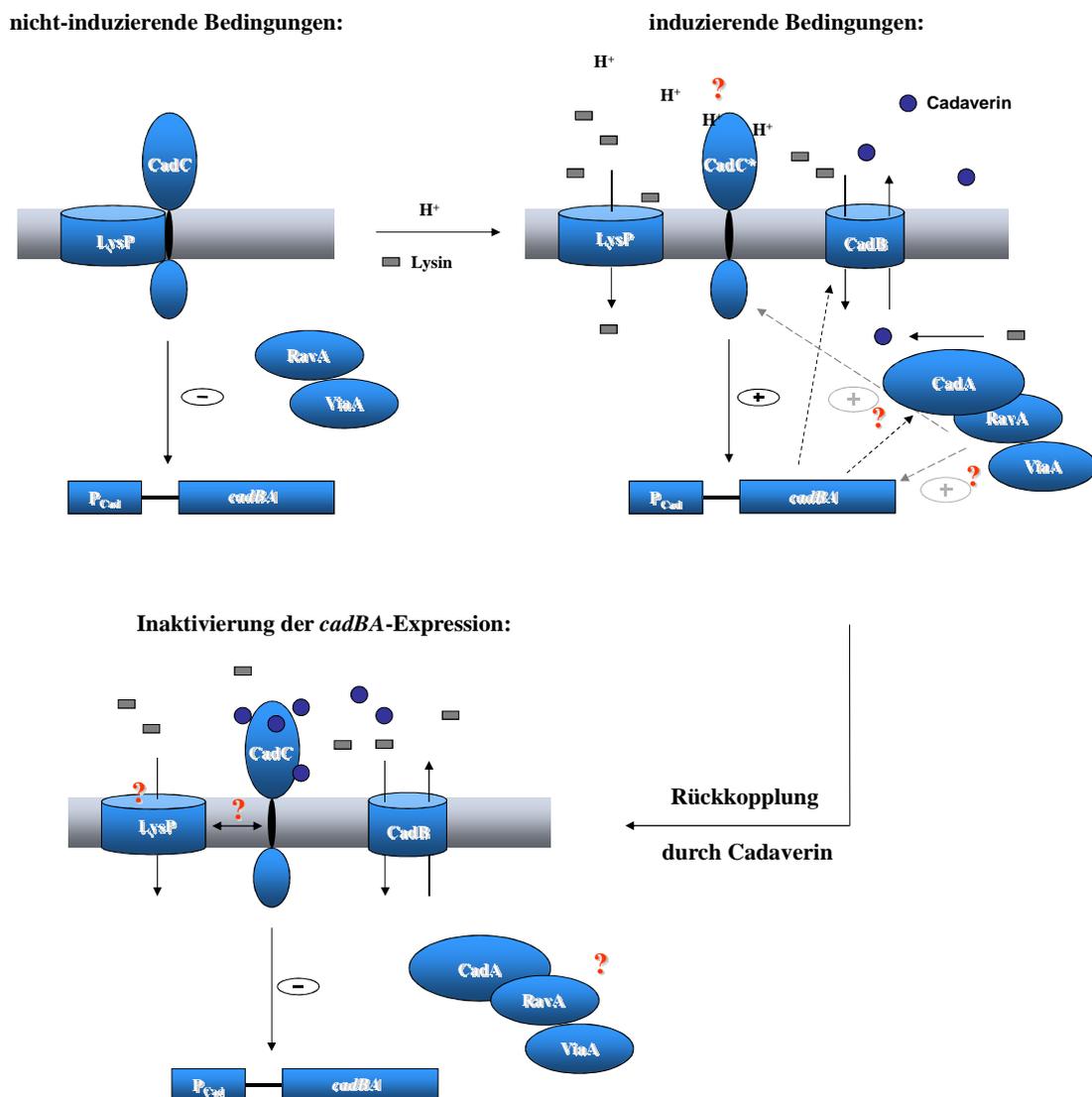


Abb. 39: Aktivierung und Inaktivierung der *cadBA*-Expression in *E. coli*

Die Details zur Abbildung sind im Text erklärt. Die Rolle von H-NS unter nicht-induzierenden Bedingungen und die negative Regulation der *cadBA*-Expression durch CO₂ sind hier nicht dargestellt.

Das bei der Decarboxylierung entstehende Cadaverin wird durch CadB nach außen transportiert, im Gegenzug wird Lysin importiert. Ab einer bestimmten Konzentration bindet Cadaverin an die periplasmatische Domäne von CadC und beendet somit die Transkription von *cadBA*.

Noch nicht geklärt in diesem Modell ist die Frage, welche Rolle die Komplexbildung von RavA mit CadA spielt und ob bzw. wann diese Komplexbildung aufgelöst wird. Ebenfalls nicht bekannt ist, wie lange LysP nach Auflösung der Interaktion mit CadC als Lysin-Transporter fungiert oder ob evtl. eine Degradation dieses Proteins erfolgt. Ebenso unklar ist, ab wann *lysP* wieder exprimiert wird und ab welchem Zeitpunkt LysP erneut mit CadC interagiert.

Das direkte Zusammenspiel von Transportprozessen und Signaltransduktion über Protein/Protein-Interaktionen, wie es am Beispiel der Regulation des Cad-Systems durch LysP gezeigt werden konnte, ist bereits für weitere Systeme beschrieben worden, in *E. coli* spielt dieses Prinzip v. a. im Zuckerstoffwechsel eine Rolle. Als Beispiel sei hier die Interaktion zwischen dem globalen Transkriptionsregulator Mlc und der Glucose-transportierenden Untereinheit des Phosphotransferase-Proteins PtsG in *E. coli* genannt (Lee *et al.*, 2000). Mlc ist ein negativer Regulator des Phosphotransferasesystems (Kim *et al.*, 1999; Plumbridge, 1999; Tanaka *et al.*, 1999). Ist keine Glucose vorhanden, so liegt die Glucose-spezifische Permease PtsG in der phosphorylierten Form vor, Mlc reprimiert gleichzeitig zahlreiche Gene, die für das Phosphotransferasesystem eine Rolle spielen. Glucose-Transport resultiert in einer Dephosphorylierung von PtsG und Aufhebung der Repression durch Mlc aufgrund einer Bindung von Mlc an dephosphoryliertes PtsG (Lee *et al.*, 2000).

Ein ähnliches Prinzip wurde für das Uhp-System in *E. coli* beschrieben, das die Expression von *uhpT* reguliert. *uhpT* kodiert für den Zucker-Phosphat-Transporter UhpT. Bei der Sensierung des Liganden Glucose-6-Phosphat sind zwei membranständige Proteine beteiligt, zum einen das Rezeptorprotein UhpC, das den Reiz sensiert, und zum anderen die Sensorkinase UhpB, die durch die Interaktion mit UhpC aktiviert wird. Dies führt zur Autophosphorylierung der löslichen Transmitterdomäne von UhpB und anschließend zum Transfer der Phosphorylgruppe zu dem Antwortregulator UhpA, der die Expression von *uhpT* aktiviert (Verhamme *et al.*, 2001).

In *Listeria monocytogenes* ist das Phosphotransferasesystem mit der Virulenz-Genexpression gekoppelt. Der Virulenz-Regulator PfrA aktiviert die Expression zahlreicher Gene, die für die Virulenz dieses Pathogens verantwortlich sind. Hierzu zählen u. a. Gene, die bei der Invasion der Wirtszellen eine Rolle spielen (Dramsı *et al.*, 1993), oder auch für die Bildung des

Hämolytins Listeriolysin O von Bedeutung sind (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990). In Minimalmedium mit Glucose als C-Quelle kam es zu einer starken Hemmung des Wachstums von *L. monocytogenes*, wenn gleichzeitig PfrA überproduziert wurde. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich eine Störung der Glucose-Aufnahme durch das Phosphotransferasesystem. Die Autoren vermuten eine Interaktion zwischen PfrA und einer noch unbekannt Komponente des Phosphotransferasesystems, welche durch eine hohe PfrA-Konzentration inhibiert wird (Marr *et al.*, 2006).

Das direkte Zusammenspiel von Transportprozessen und Signaltransduktion stellt somit ein sehr elegantes System für die Zelle dar, den Flux eines Metaboliten über die Membran zu regulieren und gleichzeitig die Genexpression in Abhängigkeit dieses Metaboliten zu steuern. Dies erklärt möglicherweise auch die Membranverankerung mancher Transkriptionsaktivatoren, wie z. B. CadC.

4.5 Versuche zur Strukturaufklärung von CadC

Als Beispiel eines Transkriptionsaktivators aus der Familie der ToxR-ähnlichen Proteine sollte die Struktur von CadC mit Hilfe von Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. Mit dieser Technik kann die dreidimensionale Struktur von Proteinen bis zu atomarer Auflösung ermittelt werden. Voraussetzung hierfür ist das Vorliegen eines Proteinkristalls. In einem Kristall sind die atomaren Bausteine in dreidimensional periodischer Weise angeordnet und zeigen eine charakteristische Beugung von Röntgenstrahlung, wobei die Amplitude des an einem Atom gebeugten Strahls dessen Elektronenzahl proportional ist. Die gebeugten Wellen treten wieder zusammen, wobei jedes Atom einen Beitrag zu jedem gebeugten Strahl leistet. Sind die gebeugten Wellen in Phase, so verstärken sie sich, wenn sie nicht in Phase sind, löschen sie sich aus (Interferenz). Die Anordnung der Atome bestimmt, wie die gebeugten Wellen wieder zusammentreten. Nachteil der Proteinkristallisation ist, dass die Konformation des Proteins nicht der nativen Konformation entsprechen muss, außerdem sind keinerlei Aussagen über die Dynamik des Proteins möglich. Dennoch ist eine definitive Aufklärung der Struktur möglich, die Auflösung kann bis zu 1 Å betragen, somit kann die Anordnung von einzelnen Atomen aufgelöst werden (Blundell und Johnson, 1976).

Um Kristalle zu erhalten, wird entweder die *sitting drop*-Methode oder die *hanging drop*-Methode angewandt. In einer Kristallisationskammer befindet sich die hochkonzentrierte Proteinlösung zusammen mit einem Fällungsmittel (auf einer Erhöhung: *sitting drop*; an der Unterseite eines Deckglases: *hanging drop*). Da das Fällungsmittel in der

Kristallisationskammer höher konzentriert vorliegt als in der Proteinlösung, tritt mit der Zeit Wasser aus der Proteinlösung und das Protein kristallisiert, da dessen Löslichkeit herabgesetzt wird. Voraussetzung für eine Proteinkristallisation ist eine sehr reine und hochkonzentrierte Proteinlösung, und ausreichende Mengen an Protein. Ob und wann ein Protein kristallisiert, muss durch zahlreiche verschiedene Fällungsbedingungen herausgefunden werden. Werden Bedingungen gefunden, bei denen kleine Kristalle entstehen, so müssen diese so optimiert werden, dass Kristalle mit einer hohen Streukraft entstehen.

4.5.1 Versuche zur Kristallisation von CadC188-512

Zunächst wurde die Struktur der isolierten periplasmatischen Domäne von CadC (CadC188-512) untersucht. Diese wurde hierzu als Fusion mit Thioredoxin (LaVallie *et al.*, 1993) produziert und gereinigt (Trx-CadC188-512). Auch diese lösliche Domäne von CadC neigte zu unspezifischer Aggregation, die Fusion mit Thioredoxin konnte die Löslichkeit jedoch deutlich erhöhen, so dass ausreichend Protein aus dem Cytoplasma gereinigt werden konnte. Mit Hilfe von Thrombin konnte das fusionierte Thioredoxin sehr gut abgespalten werden. CadC188-512 und Thioredoxin wurden anschließend über Gelfiltration voneinander getrennt. Die Reinheit des Proteins war ca. 95%. Bei der anschließenden Ankonzentrierung tendierte CadC188-512 ebenfalls zu unspezifischer Aggregation, dennoch gelang es, die erforderliche Konzentration von ca. 10 mg/mL zu erhalten. Bei 2 Fällungsbedingungen wurden Kristalle erhalten, einer davon wurde am Synchrotron vermessen. Die Auflösung betrug ca. 2,5 Å und war zu niedrig für die Aufklärung der Struktur, da die periplasmatische Domäne von CadC keine Homologien zu bekannten Strukturen aufweist. Um größere Kristalle zu erhalten, wurden zahlreiche weitere Kristallisationsansätze angesetzt.

Doch auch wenn eine hohe Auflösung erzielt wird, kann die Struktur eines Proteins noch nicht exakt aufgeklärt werden, da zunächst noch das sog. Phasenproblem gelöst werden muss. Eine genaue Bestimmung der atomaren Anordnung im Kristall ist nur möglich, wenn auch die Phase, die zu jedem gestreuten Elektronenstrahl gehört, aufgelöst wird. Dieses Problem kann durch die Bildung von isomorphen Kristallen behoben werden. Hierbei werden z. B. Schweratome in einen Kristall eingebaut, die Proteinstruktur bleibt unverändert, aber durch die größere Anzahl von Elektronen wird eine wesentlich stärkere Beugung erzielt. Erste Versuche, Selenomethionin in CadC188-512 einzubauen, scheiterten aber, da das Protein unter diesen Bedingungen nicht produziert wurde. Eine neue Methode für die Lösung des Phasenproblems ist die Nutzung von spezifischen Strahlenschäden, z. B. die Reduktion von Disulfidbrücken durch Radikale (UVRIP, *UV radiation damage-induced phasing*; Nanao und

Ravelli, 2006). Hiermit lässt sich z. B. die Position der Cysteine in einem Protein zuordnen, indem zuerst ein Datensatz des Kristalls unter nativen Bedingungen aufgenommen wird und dann nach UV-Bestrahlung des Kristalls ein weiterer Datensatz aufgenommen wird. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die beiden Cysteine der periplasmatischen Domäne von CadC möglicherweise eine Disulfidbrücke ausbilden.

4.5.1.1 Nachweis einer Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne von CadC

Um *in vitro* zu untersuchen, ob die Cysteine C208 und C272 eine Disulfidbrücke ausbilden, wurde zunächst gereinigtes CadC188-512, nach Denaturierung mit 2% (w/v) SDS, unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen mit dem Thiol-selektiven Polyethylenglycol-Maleimid (PEG-Maleimid) inkubiert. Die Cysteinreste in CadC188-512 waren nur zugänglich, wenn vor der Inkubation mit PEG-Maleimid eine Reduktion des Proteins erfolgt war. Dies konnte anhand von zusätzlichen, höhermolekularen Proteinbanden in einer SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden, welche die markierte Form von CadC188-512 darstellten. Da die Cysteinreste erst nach der Reduktion des Proteins für PEG-Maleimid zugänglich waren, wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen entweder eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinresten der periplasmatischen Domäne ausgebildet, oder aber andere Peptide des Cytosols (z. B. Glutathion) waren an die Cysteinreste über eine Disulfidbindung gekoppelt, welche auch nach der Reinigung von CadC188-512 noch vorhanden war. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde CadC188-512 unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Befand sich kein Reduktionsmittel im Ansatz, so wanderte CadC188-512 schneller im Gel als unter reduzierenden Bedingungen, vermutlich führte die Ausbildung der Disulfidbrücke zu einer kompakteren Struktur des Proteins, die in einer höheren Mobilität resultierte. Ähnliches wurde bereits für die β -Lactamase (Pollitt und Zalkin, 1983) und für OxyR (Tao, 1999) gezeigt. Diese Ergebnisse bestätigten die Ausbildung einer Disulfidbrücke *in vitro*. Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Disulfidbrücke eine strukturelle und/oder funktionelle Rolle spielt. So ist beispielsweise die Chaperon-Aktivität des Hitzschock-Proteins Hsp33 abhängig vom Redoxzustand, nur die oxidierte Form ist aktiv (Jakob *et al.*, 1999). Auch der Transkriptionsregulator OxyR wird durch die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke aktiviert (Zheng *et al.*, 1998).

Um die Funktion der Disulfidbrücke *in vitro* zu untersuchen, wurden zunächst Messungen der Tryptophanfluoreszenz mit reduziertem CadC188-512 durchgeführt und die Affinität für Cadaverin bestimmt. Die Bindung von Cadaverin schien jedoch kaum beeinflusst worden zu

sein, da die Affinität für Cadaverin nur leicht erniedrigt war (Faktor 1,3 geringer im Vergleich zu nicht-reduziertem CadC188-512).

Die Cysteinreste der periplasmatischen Domäne von CadC erwiesen sich in anderen CadC-Proteinen aus verschiedenen *Escherichia*- und *Salmonella*-Arten als konserviert, was eine wichtige Funktion sehr wahrscheinlich macht (Dönhöfer, 2007). Die physiologische Bedeutung der Disulfidbrücke wurde deshalb *in vivo* genauer analysiert. Hierfür wurden die Cysteinreste gegen Alanin ausgetauscht, entweder einzeln, oder beide zusammen, und anhand der β -Galaktosidase-Aktivität die *cadBA*-Expression in *E. coli* EP314 analysiert. Sobald einer der beiden Cysteinreste ausgetauscht wurde, war ein ähnlicher Phänotyp wie bei *lysP*-negativen Stämmen zu beobachten, sowohl eine erhöhte *cadBA*-Expression bei Anwesenheit von Lysin, als auch eine Lysin-unabhängige Induktion der *cadBA*-Expression. Der deutlichste Effekt wurde bei dem CadC-Derivat CadC-C272A beobachtet, in *E. coli* EP314-CadC-C272A war die Expression um einen Faktor ~ 2 erhöht (im Vergleich zu *E. coli* EP314-CadC). Bei einer Überproduktion von LysP wurde in EP314-pET16b-*cadC* die β -Galaktosidase-Aktivität auf ca. 69% der Ausgangsaktivität gesenkt, in EP314-pET16b-*cadC*-272A blieb die *cadBA*-Expression jedoch unbeeinflusst von einer LysP-Überproduktion. Somit waren sowohl die Signaltransduktion als auch die Wechselwirkung zwischen CadC und LysP durch das Fehlen der Disulfidbrücke gestört. Wie bereits unter 4.4 erläutert, könnte die Auflösung der Disulfidbrücke einen „semi-aktiven“ Zustand von CadC darstellen (Abb. 40). Denkbar wäre, dass die Wahrnehmung des niedrigen pH-Wertes durch CadC oder das Vorhandensein von Lysin (aufgrund einer Konformationsänderung in LysP) zum einen zu einer Destabilisierung der Interaktion von CadC mit LysP führt, zum anderen zu einer räumlichen Nähe der Disulfidbrücke zur Membran. Da im Bereich der Membran eher reduzierende Bedingungen vorliegen, wäre die Auflösung der Disulfidbrücke denkbar. Durch die Reduktion der Disulfidbrücke wäre das „semi-aktive“ CadC zugänglich für den zweiten Reiz, so dass eine erneute Konformationsänderung das Protein voll aktiviert (CadC*). Die Reihenfolge der Reizwahrnehmung ist dabei nicht von Bedeutung (Dönhöfer, 2007). Interessanterweise ergab eine Analyse der Aminosäuresequenz von CadC mit Hilfe der Software ZPRED (Granseth *et al.*, 2006) ein Cluster von hydrophoben Aminosäuren in der periplasmatischen Domäne von CadC im Bereich von Y219 bis V239 (Daniel Hilger, persönliche Mitteilung), die möglicherweise während einer Konformationsänderung innerhalb der Membran liegen könnten.

Denkbar wäre auch das Vorhandensein eines Proteins, das die Reduktion der Disulfidbrücke katalysiert. Im Periplasma von *E. coli* ist für die Ausbildung von Disulfidbrücken das *dsb*

System zuständig, das sowohl eine Rolle bei der Proteinfaltung als auch bei der Reduktion von falsch ausgebildeten Disulfidbrücken spielt (Collet und Bardwell, 2002).

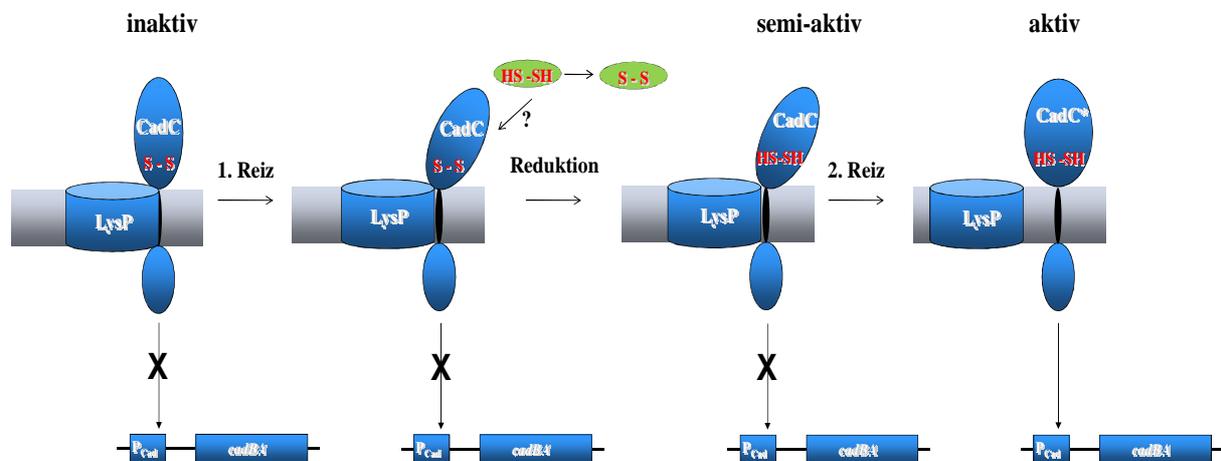


Abb. 40: Modell der Aktivierung von CadC durch Auflösung der Disulfidbrücke

Das Vorhandensein eines der beiden Reize (niedriger pH-Wert oder Lysin) führt zu einer Destabilisierung der Interaktion von CadC mit LysP, die z. B. in einer räumlichen Nähe der Disulfidbrücke zur Membran oder in einer Interaktion mit einem möglichen Katalysatorprotein (grün dargestellt) resultiert. Dann erfolgt die Reduktion der Disulfidbrücke und das „semi-aktive“ CadC wird zugänglich für den zweiten Reiz. Durch eine erneute Konformationsänderung wird CadC dann voll aktiviert (CadC*). Die Reihenfolge, in der die Reize wahrgenommen werden, ist dabei nicht von Bedeutung.

Auch ToxR besitzt 2 Cysteinreste in der periplasmatischen Domäne (C236 und C293). Diese scheinen jedoch in der Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen 2 ToxR-Monomeren eine Rolle zu spielen und haben somit eine Funktion bei der Dimerisierung von ToxR (Chatterjee *et al.*, 2007). Auch für CadC wurde eine Oligomerisierung vorgeschlagen (Küper, 2005). Mittels Quervernetzungsstudien wurde die Ausbildung von CadC-Komplexen gezeigt, die wahrscheinlich CadC-Tetramere darstellten. Bei dem CadC-Derivat CadC1-215 (Fehlen der periplasmatischen Domäne) konnte kein oligomerer Zustand detektiert werden, was eine Oligomerisierung von CadC über die periplasmatische Domäne indiziert. Die Reinigung von CadC188-512 mit Hilfe von Gelfiltration indizierte eine Dimerisierung der periplasmatischen Domäne *in vitro* (Arne Skerra, persönliche Mitteilung). Auch *in vivo* konnte mit Hilfe eines Lambda-Fusions-Systems die Ausbildung von CadC-Oligomeren gezeigt werden. Mit Hilfe von CadC-Hybridproteinen wurde die Repression eines *lacZ*-Gens untersucht, welche als Maß für die Oligomerisierung diente. Diese Studien ergaben, dass es sich bei den CadC-Oligomeren um Tetramere oder kooperativ bindende Dimere handelte. Jedoch wurde weder *in vitro* noch *in vivo* ein signifikanter Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die

Oligomerisierung von CadC beobachtet, vielmehr schien CadC immer als Oligomer vorzuliegen (Küper, 2005).

Auch für ToxR konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen induzierenden Bedingungen und dem Oligomerisierungsgrad des Proteins nachgewiesen werden, außerdem wurden sowohl ToxR-Homodimere als auch Heterodimere, bestehend aus ToxR und ToxS, gezeigt (Ottemann und Mekalanos, 1996). Daher bleibt die Bedeutung des Oligomerisierungszustandes für die Aktivierung und Signaltransduktion von ToxR-ähnlichen Proteinen unklar.

4.5.2 Optimierung der Reinigung von CadC

Voraussetzung für eine Proteinkristallisation ist eine sehr reine und hochkonzentrierte Proteinlösung. Bei der Reinigung von CadC bestand das Problem, dass nach der Affinitätschromatographie noch zahlreiche Verunreinigungen in der Proteinlösung waren, welche möglicherweise eine Kristallisation erschwerten. Des Weiteren wurde die Reinigung von CadC durch proteolytischen Abbau erschwert, der auch durch Protease-Inhibitoren nur geringfügig unterdrückt werden konnte. So wurde beispielsweise bereits das Auftreten eines C-terminalen Abbauprodukts beschrieben, welches die Hypothese der regulierten Proteolyse bei der Aktivierung von CadC stützte (Küper, 2005). Auch die weitere Reinigung mit Hilfe von Gelfiltration war wenig erfolgreich, vermutlich war hierbei das Problem, dass Proteinverunreinigungen zusammen mit CadC in Micellen vorlagen und deshalb von der Säule eluiert wurden. Trotz der relativ geringen hydrophoben Anteile zeigte CadC außerdem eine hohe Tendenz unspezifische Aggregate zu bilden, was v. a. bei der Ankonzentrierung des Proteins ein Problem war, so dass nur wenig Protein für die Kristallisation eingesetzt werden konnte. Dennoch wurde CadC auf eine Konzentration von ~ 4 mg/mL konzentriert und mit verschiedenen Fällungsreagenzien versetzt, jedoch wurden bis zum Ende der vorliegenden Arbeit keine Proteinkristalle erhalten.

4.6 Ausblick

Um einen detaillierten Überblick über den zeitlichen Verlauf des Cad-Systems in Gegenwart von induzierenden Bedingungen zu erhalten und daraus ein mathematisches Modell zu erstellen, müssen alle Komponenten, die an diesem System beteiligt sind, genau analysiert werden. Noch ist z. B. nicht klar was mit LysP nach Auflösung der Interaktion mit CadC geschieht. Zwar muss zunächst Lysin durch LysP in die Zelle transportiert werden, damit CadB als Antiporter fungieren kann, es stellt sich jedoch die Frage, ob der Transport von

Lysin dann ausschließlich durch CadB erfolgt. So könnte beispielsweise die Expression von *lysP* mit *lysP*-spezifischen Sonden und die LysP-Synthese mittels Antikörper genauer untersucht werden.

Auch die Funktion von RavA bzw. ViaA bei der Aktivierung der *cadBA*-Transkription muss genauer charakterisiert werden. Möglicherweise spielen sie eine Rolle als Faltungshelfer oder Stabilisatoren für CadC. Eine mögliche Interaktion zwischen CadC und RavA/ViaA könnte mittels Oberflächenplasmaresonanz erfolgen, oder auch über *Pull-Down*-Experimente mit rekonstituiertem CadC.

Eine direkte Interaktion zwischen CadC und LysP könnte *in vivo* mittels FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) nachgewiesen werden. Bei dieser Methode werden zwei unterschiedliche Fluorophore verwendet, wobei das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen muss. Ist eine räumliche Nähe zwischen den Fluorophoren gegeben, kommt es zum Energietransfer. Als Fluorophore können beispielweise Fluoreszenzproteine wie CyPet und YPet verwendet werden (Nguyen und Daugherty, 2005). Erste Experimente werden bereits durchgeführt, bei denen die Hybridproteine CyPet-LysP und YPet-CadC untersucht werden. Eine räumliche Nähe von CadC und LysP in der Zelle würde dann zu einem Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren führen.

Da bei der Interaktion von CadC mit LysP die Transmembranhelix (TM) von CadC beteiligt zu sein scheint, könnte das sog. *TOXCAT*-System verwendet werden (Russ und Engelman, 1999). Mit dieser Methode können direkt Interaktionen von Transmembranhelizes untersucht werden. Hierbei würde sowohl an die TM von CadC als auch eine der 12 TM von LysP die cytoplasmatische Domäne von ToxR fusioniert werden, wobei sich v. a. TM XI und TM XII von LysP anbieten würden, da deren Funktion nicht klar ist (Jung *et al.*, 2007). Die Assoziation der TM ermöglicht die Dimerisierung der ToxR-Domäne und das Reporterogen *cat* (Chloramphenicol-Acetyltransferase) wird aktiviert. Ein ähnliches System hierfür ist die von Schneider und Engelman entwickelte *GALLEX*-Methode, welche anstelle von ToxR die DNA-Bindedomäne von LexA verwendet. Mit dieser Methode wurde sowohl Homodimerisierung als auch Heterodimerisierung von Proteinen gezeigt (Schneider und Engelman, 2003).

Um die Auflösung der Inhibierung von CadC durch LysP mittels Lysin besser zu verstehen, müssen verschiedene *lysP*-Mutanten bezüglich der Interaktion mit CadC und bezüglich der Transportaktivität analysiert werden. Hierbei sind zum einen *lysP*-Mutanten interessant, die Lysin nicht transportieren können, jedoch die *cadBA*-Expression noch regulieren können, wie z. B. der in der vorliegenden Arbeit beschriebene *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S, zum anderen

müssen *lysP*-Mutanten charakterisiert werden, die Lysin transportieren, aber keine regulatorische Funktion bezüglich der *cadBA*-Expression ausüben.

Von Interesse ist besonders auch der Aktivierungsmechanismus von CadC. Inwiefern hier die Disulfidbrücke eine Rolle spielt, muss weiter getestet werden. Hierfür sollten die von Dönhöfer (2007) angefangenen Arbeiten weitergeführt werden, bei denen ein Cysteinrest durch das basische Lysin und der andere Cysteinrest durch das saure Aspartat substituiert wurde. Dies resultiert möglicherweise in der Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen, die in Gegenwart von induzierenden Bedingungen nicht aufgelöst werden können, so dass die Weiterleitung der Reize nicht mehr möglich ist. In diesem Zusammenhang sollte auch die Rolle der Aminosäuren Y219 bis V239 der periplasmatischen Domäne von CadC analysiert werden. Dieses Cluster an hydrophoben Aminosäuren könnte bei einer Konformationsänderung von CadC (nach Wahrnehmung eines niedrigen pH-Wertes oder der Auflösung der Interaktion mit LysP) an die Cytoplasmamembran assoziieren, was möglicherweise eine räumliche Nähe der Disulfidbrücke zur Membran bewirkt. Da in der Cytoplasmamembran eher reduzierende Bedingungen vorliegen, könnte die Disulfidbrücke aufgelöst werden, so dass CadC eine Konformation einnimmt, in der auch der zweite Reiz wahrgenommen werden kann. Würde man dieses Aminosäure-Cluster austauschen, beispielsweise gegen hydrophile Aminosäurereste, so sollte CadC nicht mehr aktiviert werden.

Auch die Bindung von Cadaverin durch CadC sollte genauer untersucht werden. Kürzlich konnten für die Cadaverin-Bindung wichtige Aminosäuren in CadB identifiziert werden (Soksawatmaekhin *et al.*, 2006). Mit Hilfe von Sequenzvergleichen zwischen CadC und CadB könnte eine mögliche Bindestelle in CadC identifiziert und die beteiligten Aminosäuren ausgetauscht werden. Mit Hilfe von Affinitätsmessungen könnte eine Rolle dieser Aminosäuren bei der Cadaverin-Bindung bestätigt werden.

Für die Strukturauflösung der periplasmatischen Domäne von CadC ist es nötig, ausreichend große Kristalle zu erhalten um eine erneute Synchrotron-Messung durchführen zu können. Um das Phasenproblem zu lösen, kann man sich die Disulfidbrücke in der periplasmatischen Domäne zu Nutzen machen. Denkbar wäre auch ein Tränken des Kristalls in Schweratomderivaten oder die Anwendung der sog. SAD-Methode (*single-wavelength anomalous diffraction*; Terwilliger und Berendzen, 1999). Auch eine Co-Kristallisation mit dem Ligand Cadaverin wäre vorstellbar, dies würde möglicherweise das Protein stabilisieren, außerdem könnte man dadurch die Bindestelle im Protein herausfinden. So konnte z. B. vor kurzem OpuAC von *B. subtilis* mit dem Ligand Glycinbetain co-kristallisiert werden, die Auflösung der Struktur betrug 2 Å (Horn *et al.*, 2006).

Für die Kristallisation des gesamten CadC muss eine andere Reinigungsstrategie gefunden werden, da zum einen eine hochreine Proteinlösung nötig ist, zum anderen müssen ausreichend hohe Mengen an Protein gereinigt werden. Hierbei muss v. a. auf den *His-Tag* verzichtet werden, da über Ni^{2+} -NTA-Agarose auch Proteine gereinigt werden, die ein ähnliches Motiv besitzen. Es werden bereits Versuche durchgeführt, bei denen CadC an einen *Strep-Tag* (Schmidt und Skerra, 1994) fusioniert ist und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt werden kann.

Wenig bekannt ist bis jetzt über die Wahrnehmung des niedrigen pH-Werts, und ob dadurch eine Konformationsänderung in CadC induziert wird. Wenn geeignete Kristallisationsbedingungen gefunden werden, lässt sich möglicherweise durch Kristallisation bei unterschiedlichen pH-Werten eine pH-induzierte Konformationsänderung von CadC nachweisen.

5. Zusammenfassung

Das Cad-System von *E. coli* gehört zu den Säure-induzierbaren Aminosäure-Decarboxylase-Systemen und spielt eine wichtige Rolle bei der Säureschutzantwort. In diesem System erfolgt die Reizwahrnehmung, Signaltranslokation über die Membran und Transkriptionsregulation durch ein einziges Protein, nämlich CadC. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden die Regulation des Cad-Systems durch CadC und die Lysin-spezifische Permease LysP, die Reizwahrnehmung durch CadC und die Struktur von CadC untersucht.

- Mittels Transkriptions- und Translationsanalysen wurde das Cad-System in den *E. coli*-Stämmen MG1655 (Wildtyp), MG1655-*lysP211* (*lysP*-negativ) und MG1655 Δ *ravA* (*ravA/viaA*-negativ) untersucht. Die *cadBA*-Expression war in MG1655-*lysP211* deutlich höher als im Wildtyp, als Folge dessen war auch die relative Menge an CadA und die Konzentration an extrazellulärem Cadaverin erhöht. Des Weiteren war in dieser Mutante durch den Wegfall des Repressors LysP der Bedarf an extrazellulärem Lysin als Induktor der *cadBA*-Expression vollständig eliminiert. In MG1655 Δ *ravA* hingegen war die *cadBA*-Expression im Vergleich zum Wildtyp reduziert, was sich in einer geringeren relativen CadA-Menge und einer niedrigeren Konzentration an extrazellulärem Cadaverin widerspiegelte.
- In Zusammenarbeit mit dem Institut für Theoretische Physik der Universität zu Köln wurde anhand der für *E. coli* MG1655 (Wildtyp) gemessenen Daten ein mathematisches Modell erstellt und mit Hilfe dieser Daten die Dynamik des Cad-Systems in *E. coli* MG1655-*lysP211* und *E. coli* MG1655 Δ *ravA* berechnet. Die *in vivo* bestimmten Ergebnisse wurden durch die *in silico* erhaltenen Daten sehr gut wiedergegeben.
- Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass CadC kein Sensor für Lysin ist. *In vitro* Experimente (ITC-Messungen, Tryptophanfluoreszenz-Messungen) ergaben, dass CadC nur eine extrem niedrige Affinität für Lysin aufweist ($K_D[\text{CadC}] = 22,5 \text{ mM}$, bestimmt mit ITC; $K_D[\text{CadC188-512}] = 2,29 \text{ mM}$, bestimmt mit Fluoreszenz-Messungen). *In vivo* war ein bestimmter Schwellenwert für die Induktion der *cadBA*-Expression nötig, ansonsten hatte die Lysin-Konzentration keinen Einfluss. Wurde jedoch gleichzeitig LysP überproduziert, so konnte Lysin die hemmende Wirkung von LysP auf die *cadBA*-Expression teilweise wieder aufheben.

- Da Lysin nicht durch CadC wahrgenommen wird und somit die Interaktion zwischen CadC und dem Transportprotein LysP nicht über die Konkurrenz beider Proteine um das Substrat Lysin erfolgt, beruht die Lysin-Abhängigkeit der *cadBA*-Expression vermutlich auf einer direkten Interaktion zwischen CadC und LysP. *In vivo* Experimente zeigten, dass diese Interaktion nicht über die periplasmatische Domäne von CadC stattfindet. *In vitro* konnten CadC und LysP in Proteoliposomen quervernetzt werden, dies indizierte eine Affinität beider Proteine zueinander.
- Das Vorhandensein von Lysin löst die Interaktion zwischen CadC und LysP auf und ist somit ein wichtiger Schritt für die Aktivierung von CadC. Die Lysin-abhängige *cadBA*-Expression in dem Lysin-Transport-inaktiven *E. coli* MG1655-*lysP*-G153S lässt vermuten, dass der Lysin-Transport durch LysP keine Voraussetzung für die Auflösung der Interaktion zwischen CadC und LysP ist. Die Wahrnehmung von Lysin durch LysP scheint bereits ausreichend für die Aufhebung der Wechselwirkung beider Proteine zu sein.
- Durch Messungen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz mit der periplasmatischen Domäne von CadC (CadC188-512) konnte gezeigt werden, dass diese eine Affinität für den Inhibitor Cadaverin aufweist, der K_D -Wert hierfür betrug 96 μM . *In vivo* Experimente bestätigten, dass das Vorhandensein der periplasmatischen Domäne für die Hemmung der *cadBA*-Expression durch Cadaverin essentiell ist. Somit scheint die Inhibierung der *cadBA*-Expression durch Cadaverin über eine direkte Interaktion mit der periplasmatischen Domäne von CadC zu erfolgen
- In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München wurden Strukturuntersuchungen zu CadC188-512 und CadC mittels 3D-Kristallisation durchgeführt. CadC188-512 konnte sehr gut überproduziert und gereinigt werden, und es entstanden bereits Kristalle, von denen einer am Synchrotron vermessen werden konnte. Die Auflösung (2,5 Å) war jedoch für eine Strukturaufklärung noch zu gering. CadC konnte überproduziert, gereinigt und mit verschiedenen Fällungsreagenzien versetzt werden, jedoch entstanden bis zum Ende der vorliegenden Arbeit keine Proteinkristalle.

- In der periplasmatischen Domäne von CadC befinden sich zwei Cysteinreste. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten konnte die Ausbildung einer Disulfidbrücke in CadC188-512 bestätigt werden. Durch die Reduktion der Disulfidbrücke war die Affinität für den Ligand Cadaverin geringfügig vermindert. Das Auflösen der Disulfidbrücke könnte ein wichtiger Mechanismus für die Aktivierung von CadC darstellen. Wurde die Ausbildung einer Disulfidbrücke durch die Substitution der Cysteinreste durch Alanin verhindert, so wurde die *cadBA*-Expression *in vivo* Lysin-unabhängig aktiviert. Möglicherweise repräsentieren diese CadC-Derivate ein „semi-aktives“ CadC, das für eine volle Aktivierung nur noch einen Reiz benötigt.

6. Literatur

Aiba, H., Adhya, S., de Crombrughe, B. (1981): Evidence for two functional *gal*-promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* **256**: 11905-11910.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.

Applebaum, D.M., Dunlop, J.C., Morris, D.R. (1977): Comparison of the biosynthetic and degradative ornithine decarboxylases of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **16**: 1580-1584.

Auger, E.A., Redding, K.E., Plumb, T., Childs, L.C., Meng, S.-Y., Bennett, G.N. (1989): Construction of *lac* fusions to the inducible arginine- and lysine-decarboxylase genes of *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* **3**: 609-620.

Bajaj, V., Hwang, C., Lee, C.A. (1995): HilA is a novel OmpR/ToxR family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol Microbiol* **18**: 715-27.

Bakker, E.P., Mangerich, W.E. (1981): Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J Bacteriol* **147**: 820-826.

Baraquet, C., Théraulaz, L., Guiral, M., Lafitte, D., Méjean, V., and Jourlin-Castelli, C. (2006): TorT, a member of a new periplasmic binding protein family, triggers induction of the Tor respiratory system upon trimethylamine N-oxide electron-acceptor binding in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**: 38189-38199.

Bearson, S., Bearson, B., Foster, J.W. (1997): Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbio Lett* **147**: 173-180.

Bintu, L., Buchler, N.E., Garcia, H.G., Gerland, U., Hwa, T., Kondev, J., Kuhlman, T., Phillips, R. (2005a): Transcriptional regulation by the numbers: models. *Curr Opin Genet Dev* **15**:116-124. Review

Bintu, L., Buchler, N.E., Garcia, H.G., Gerland, U., Hwa, T., Kondev, J., Kuhlman, T., Phillips, R. (2005b): Transcriptional regulation by the numbers: applications. *Curr Opin Genet Dev* **15**:125-135. Review

Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., ColladoVides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.

Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.

Blundell, T. L., Johnson, L. N. (1976): Protein crystallography. *Academic Press, London*.

Boeker, E.A., Snell, E.E. (1972): Amino acid decarboxylases. 217–253. In P. Boyer (ed.), *The enzymes*, vol. 6. *Academic Press, New York, N.Y.*

- Bower, J.M., Mulvey, M.A. (2006):** Polyamine-mediated resistance of uropathogenic *Escherichia coli* to nitrosative stress. *J Bacteriol* **188**: 928-33.
- Bradford, M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Casalino, M., Latella, M.C., Prosseda, G., Colonna, B. (2003):** CadC is the preferential target of a convergent evolution driving enteroinvasive *Escherichia coli* toward a lysine decarboxylase-defective phenotype. *Infect Immun* **71**:5472-5479.
- Castanie-Cornet, M.P., Penfound, T.A., Smith, D., Elliott, J. F., Foster, J.W. (1999):** Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 3525-3535.
- Chatterjee, T., Saha, R.P., Chakrabarti, P. (2007):** Structural studies on *Vibrio cholerae* ToxR periplasmic and cytoplasmic domains. *Biochim Biophys Acta* **1774**:1331-1338.
- Chye, M.L., Guest, J.R., Pittard, J. (1986):** Cloning of the *aroP* gene and identification of its product in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **167**:749-53.
- Collet, J.F., Bardwell, J.C. (2002):** Oxidative protein folding in bacteria. *Mol Microbiol* **44**: 1-8. Review.
- Dell, C. L., Neely, M. N., Olson, E. R. (1994):** Altered pH and lysine signaling mutants of *cadC*, a gene encoding a membrane-bound transcriptional activator of the *Escherichia coli cadBA* operon. *Mol Microbiol* **14**: 7-16.
- Denhardt, D. T. (1966):** A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **23**:641-646.
- DiRita, V.J., Mekalanos, J.J. (1991):** Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. *Cell* **64**:29-37.
- DiRita, V.J., Parsot, C., Jander, G., Mekalanos, J.J. (1991):** Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:5403-5407.
- Dönhöfer, A. (2007):** Einfluss der Cysteinreste auf die Aktivität des membrangebundenen Transkriptionsaktivators CadC in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, LMU München
- Dorman, C.J. (2004):** H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* **2**: 391-400.
- Dosch, D.C., Helmer, G.L., Sutton, S.H., Salvacion, F.F., Epstein, W. (1991):** Genetic analysis of potassium transport loci in *Escherichia coli*: Evidence for three constitutive systems mediating uptake of potassium. *J Bacteriol* **173**: 687-696.
- Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C., Cossart, P. (1993):** Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator PrfA. *Mol Microbiol* **9**: 931-941.

- Dziejman, M., Mekalanos, V.J. (1994):** Analysis of membrane protein interaction: ToxR can dimerize the amino terminus of phage lambda repressor. *Mol Microbiol* **13**: 485-494.
- Egan, S., James, S., Kjelleberg, S. (2002):** Identification and characterization of a putative transcriptional regulator controlling the expression of fouling inhibitors in *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 372-378.
- Ellis, J., Carlin, A., Steffes, C., Wu, J., Rosen, B.P. (1995):** Topological analysis of the lysinespecific permease of *Escherichia coli*. *Microbiol* **141**: 1927-1935.
- Epstein, W., Kim, B.S. (1971):** Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **108**: 639-644.
- Fried, M., Crothers, D.M. (1981):** Equilibria and kinetics of *lac* repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9**: 6505-6525.
- Fritz, G., Koller, C., Burdack, K., Gerland, U., Jung, K.:** Functional constraints of molecular parts shape network topology in a bacterial stress response system. *Manuskript in Vorbereitung*
- Futatsugi, L., Saito, H., Kakegawa, T., Kobayashi, H. (1997):** Growth of an *Escherichia coli* mutant deficient in respiration. *FEMS Microbiol Lett* **156**: 141-145.
- Gajiwala, K.S., Burley, S.K. (2000):** HdeA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *J Mol Biol* **295**: 605-612.
- Gale, E.F., Epps, H.M.R. (1942):** The effect of the pH of the medium during growth on the enzymatic activities of bacteria (*Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*) and the biological significance of the changes produced. *Biochem J* **36**: 600-619.
- Gale, E.F. (1946):** The bacterial amino acid decarboxylases. *Adv Enzymol* **6**: 1-32.
- Giangrossi, M., Zattoni, S., Tramonti, A., De Biase, D., Falconi, M. (2005):** Antagonistic Role of H-NS and GadX in the Regulation of the glutamate decarboxylase-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 21498-21505.
- Goldemberg, S.H (1980):** Lysine decarboxylase mutants of *Escherichia coli*: evidence for two enzyme forms. *J Bacteriol* **141**:1428-1431.
- Gong, S., Richard, H., Foster, J.W. (2003):** YjdE (AdiC) is the arginine:agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 4402-4409.
- Gonzalez, O.R., Küper, C., Jung, K., Naval, P.C, Jr, Mendoza, E. (2007):** Parameter estimation using Simulated Annealing for S-system models of biochemical networks. *Bioinformatics* **23**: 480-486.
- Goodson, M., Rowbury, R.J. (1989):** Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value. *Lett Appl Microbiol* **8**: 77-79.

- Granseth, E., Viklund, H., Elofsson, A. (2006):** ZPRED: predicting the distance to the membrane center for residues in alpha-helical membrane proteins. *Bioinformatics* **22**: e191-e196.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J. (1995):** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-4130.
- Halsall, D.K. (1975):** Strains of *E. coli* with defective lysine transport systems. *Biochem Genet* **13**:109-124.
- Haneburger, I. (2007):** Charakterisierung des membranintegralen Transkriptionsfaktors CadC von *Escherichia coli*: Die Rolle verschiedener Aminosäuren bei der pH- und Lysinsensorik. Diplomarbeit, LMU München
- Hase, C.C., Mekalanos, J.J. (1998):** TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 730-734.
- Hersh, B.M., Farooq, F.T., Barstad, D.N., Blankenhorn, D.L., Slonczewski J.L. (1996):** A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 3978-3981.
- Higgins, D.E., Nazareno, E., DiRita, V.J. (1992):** The virulence gene activator ToxT from *Vibrio cholerae* is a member of the AraC family of transcriptional activators. *J Bacteriol* **174**: 6974-6980.
- Higgins, D. E., DiRita, V.J. (1996):** Genetic analysis of the interaction between *Vibrio cholerae* transcription activator ToxR and *toxT* promoter DNA. *J Bacteriol* **178**:1080–1087.
- Hirschfield, L.N., Zamecnik, P. (1972):** Thiosine resistant mutants of *Escherichia coli* K12 with growth medium dependent lysyl-t-RNA synthetase activity. *Biochim Biophys Acta* **259**:330-343.
- Hirschfield, I.N., Yeh, F.M., Sawyer, L.E. (1975):** Metabolites influence control of lysine transfer nbonucleic acid synthetase formation in *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**:1364-1367.
- Hommais, F., Krin, E., Coppee, J.Y., Lacroix, C., Yeramian, E., Danchin, A., Bertin, P. (2004):** GadE (YhiE): a novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**: 61-72.
- Horn, C., Jenewein, S., Sohn-Bosser, L., Bremer, E., Schmitt, L. (2005):** Biochemical and structural analysis of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuA and its isolated subunits. *J Mol Microbiol Biotechnol* **10**:76-91.
- Horn, C., Sohn-Bösser, L., Breed, J., Welte, W., Schmitt, L., Bremer, E. (2006):** Molecular determinants for substrate specificity of the ligand-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis* for the compatible solutes glycine betaine and proline betaine. *J Mol Biol* **357**:592-606.
- Iyer, R., Williams, C., Miller, C. (2003):** Arginine-agsmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 6556-6561.

- Iyer, L. M., Leipe, D. D., Koonin, E. V., Aravind, L. (2004):** Evolutionary history and higher order classification of AAA⁺ ATPases. *J Struct Biol* **146**: 11–31.
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M., Bardwell, J.C. (1999):** Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96**: 341-352.
- Jores, J., Torres, A.G., Wagner, S., Tutt, C.B., Kaper, J.B., Wieler, L.H. (2006):** Identification and characterization of "pathoadaptive mutations" of the *cadBA* operon in several intestinal *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **296**:547-552.
- Jung, K., Tjaden, B, Altendorf, K. (1997):** Purification, reconstitution and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 10847-10852.
- Jung, H., Rübenhagen, R., Tebbe, S., Leifker, K., Tholema, N., Quick, M., Schmid, R.(1998):** Topology of the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **273**:26400-26407.
- Jung, K., Krabusch, M. and Altendorf, K. (2001):** Cs⁺ induces the *kdp* operon by lowering the intracellular K⁺ concentration. *J Bacteriol* **183**: 3800-3803.
- Jung, H., Buchholz, M., Clausen, J., Nietschke, M., Revermann, A., Schmid, R., Jung, K. (2002):** CaiT of *Escherichia coli*, a new transporter catalyzing L-carnitine/gamma-butyrobetaine exchange. *J Biol Chem* **27**:39251-39258.
- Jung, H., Pirch, T., and Hilger, D. (2007):** Secondary transport of amino acids in prokaryotes. *J Membrane Biol* **213**: 119-133.
- Kaspar, S., Perozzo, R., Reinelt, S., Meyer, M., Pfister, K., Scapozza, L., Bott, M. (1999):** The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. *Mol Microbiol* **33**:858-872.
- Kaspar, S., Bott, M. (2002):** The sensor kinase CitA (DpiB) of *Escherichia coli* functions as a high-affinity citrate receptor. *Arch Microbiol* **177**:313-321.
- Keseler, I.M., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Ingraham, J., Paley, S., Paulsen, I.T., Peralta-Gil, M., Karp, P.D. (2005):** EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **33** (Database Issue): D334–D337.
- Kikuchi, Y., Kojima, H., Tanaka, T., Takatsuka, Y., Kamio, Y. (1997):** Characterization of a second lysine decarboxylase isolated from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:4486-4492.
- Kim, S.Y., Nam, T.W., Shin, D., Koo, B.M., Seok, Y.J., Ryu, S. (1999):** Purification of Mlc and analysis of its effects on the *pts* expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**:25398-25402.
- Kim, J.S., Choi, S.H., Lee, J.K. (2006):** Lysine decarboxylase expression by *Vibrio vulnificus* is induced by SoxR in response to superoxide stress. *J Bacteriol* **188**:8586-92.
- Krukonis, E.S., DiRita, V.J. (2003):** DNA binding and ToxR responsiveness by the wing domain of TcpP, an activator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Mol Cell* **12**: 157-165.

- Küper, C. (2001):** Molekulare Analyse des Transkriptionsaktivators CadC von *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Osnabrück
- Küper, C. (2005):** Charakterisierung der transkriptionellen Aktivierung des *cadBA*-Operons durch den Transmembranregulator CadC aus *Escherichia coli*. Dissertation, LMU München
- Küper, C., Jung, K. (2005):** CadC-mediated activation of the *cadBA* promoter in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **10**: 26-39.
- Kunau, W.H., Beyer, A., Franken, T., Gotte, K., Marzioch, M., Saidowsky, J., Skaletz-Rorowski, A., Wiebel, F.F. (1993):** Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics. *Biochimie* **75**:209-224.
- Kraxenberger, T. (2006):** Zum Aktivierungsmechanismus des membranintegrierten Transkriptionsregulators CadC in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, LMU München
- Krukonis, E.S., Yu, R.R., DiRita, V.J. (2000):** The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol Microbiol* **38**: 67-84.
- Laemmli, U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P F., McCoy, J.M. (1993):** A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology* **11**: 187-193.
- Lee, S.-J., Boos, W., Bouché, J.-P., Plumbbridge, J. (2000):** Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *EMBO J* **19**: 5353-5361.
- Leimeister-Wächter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., Chakraborty, T. (1990):** Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:8336–8340.
- Lemonnier, M., Lane, D. (1998):** Expression of the second lysine decarboxylase gene of *Escherichia coli*. *Microbiol* **144**: 751-760.
- Lin, L.N., Li, J., Brandts, J.F., Weis, R.M. (1994):** The serine receptor of bacterial chemotaxis exhibits half-site saturation for serine binding. *Biochemistry* **33**: 6564-6570.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951):** Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Ma, Z., Richard, H., Tucker, D.L., Conway, T., Foster, J.W. (2002):** Collaborative regulation of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX and GadW (YhiW). *J Bacteriol* **184**:7001-12.

- Ma, Z., Gong, S., Richard, H., Tucker, D.L., Conway, T., Foster, J.W. (2003):** GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **49**: 1309-1320.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982):** Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York
- Marr, A.K., Joseph, B., Mertins, S., Ecke, R., Müller-Altrock, S., Goebel, W. (2006):** Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake. *J Bacteriol* **188**: 3887-3901.
- Martinez-Hackert, E., Stock, A.M. (1997):** Structural relationships in the OmpR family of winged helix transcription factors. *J Mol Biol* **269**: 301-312.
- Matson, J.S., DiRita, V.J. (2005):** Degradation of the membrane-localized virulence activator TcpP by the YaeL protease in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**: 16403-16408.
- Maurer, L.M., Yohannes, E., Bondurant, S.S., Radmacher, M., Slonczewski, J.L. (2005):** pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol* **187**: 304-319.
- Meng, S.Y., Bennett, G.N. (1992a):** Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli cad* operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *J Bacteriol* **174**: 2659-2669.
- Meng, S.Y., Bennett, G.N. (1992b):** Regulation of the *Escherichia coli cad* operon - location of a site required for acid induction. *J Bacteriol* **174**: 2670-2678.
- Merrell, D.S., Camilli, A. (2000):** Regulation of *Vibrio cholerae* genes required for acid tolerance by a member of the "ToxR-like" family of transcriptional regulators. *J Bacteriol* **182**: 5342-5350.
- Milburn, M.V., Prive, G.G., Milligan, D.L., Scott, W.G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshland, D.E. Jr, Kim, S.H. (1991):** Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science* **254**:1342-1347.
- Miller, J. H. (1972):** Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York
- Miller, V.L., Taylor, R.K., Mekalanos, J.J. (1987):** Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* **48**: 271-279.
- Miller, V. L., Mekalanos, J. J. (1988):** A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* **170**: 2575-2583.
- Miller, V.L., DiRita, V.J, Mekalanos, J.J. (1989):** Identification of *toxS*, a regulatory gene whose product enhances ToxR-mediated activation of the cholera toxin promoter. *J Bacteriol* **171**:1288-9123.

- Miller, J.H. (1992):** A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York
- Moreau, P.L. (2007):** The lysine decarboxylase CadA protects *Escherichia coli* starved of phosphate against fermentation acids. *J Bacteriol* 2007 **189**:2249-2261.
- Morris, D.R., Fillingame, R.H. (1974):** Regulation of amino acid decarboxylation. *Annu Rev Biochem* **43**: 303-325. Review
- Mus-Veteau, I., Pourcher, T., Leblanc, G. (1995):** Melibiose permease of *Escherichia coli*: substrate-induced conformational changes monitored by tryptophan fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **34**:6775-83.
- Nanao, M.H., Ravelli, R.B.G. (2006):** Phasing macromolecular structures with UV-induced structural changes. *Structure* **14**: 791-800.
- Neely, M.N., Dell, C.L., Olson, E.R. (1994):** Roles of LysP and CadC in mediating the lysine requirement for acid inductin of the *Escherichia coli cad* operon. *J Bacteriol* **176**: 3278-3285.
- Neely, M.N., Olson, E.R. (1996):** Kinetics of expression of the *Escherichia coli cad* operon as a function of pH and lysine. *J Bacteriol* **178**: 5522-5528.
- Nguyen, A.W., Daugherty, P.S. (2005):** Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat Biotechnol* **23**:355-360.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., Koonin, E.V. (1999):** AAA⁺: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**: 27-43.
- Ogura, T., Wilkinson, A.J. (2001):** AAA⁺ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* **6**:575-597.
- Ottemann, K.M., Mekalanos, J.J. (1996):** The ToxR protein of *Vibrio cholerae* forms homodimers and heterodimers. *J Bacteriol* **178**: 156-162.
- Owen-Hughes, T.A., Pavitt G.D., Santos, D.S., Sidebotham, J.M., Hulton, C.S.J., Hinton, J.C.D., Higgins, C.F. (1992):** The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell* **71**: 255-265.
- Padan, E., Zilberstein, D, Rottenberg, H. (1976):** The proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells. *Eur J Biochem* **63**:533-541.
- Pardee, A.B., Jacob, F., Monod, J. (1959):** The genetic control and cytoplasmic expression of inducibility in the synthesis of β -galactosidase of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **1**:165-178.
- Partridge, J.D., Scott, C., Tang, Y., Poole, R.K., Green, J. (2006):** *Escherichia coli* transcriptome dynamics during the transition from anaerobic to aerobic conditions. *J Biol Chem* (38):27806-27815.

- Patel, S., Latterich, M. (1998):** The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol* **8**:65-71.
- Peterson, G.L. (1977):** A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**: 346-356.
- Pfau, J.D., Taylor, R.K. (1998):** Mutations in *toxR* and *toxS* that separate transcriptional activation from DNA binding at the cholera toxin gene promoter. *J Bacteriol* **180**: 4724-33.
- Phan, A.P., Ngo, T.T., Lenhoff, H.M. (1982):** Spectrophotometric assay for lysine decarboxylase. *Anal Biochem* **120**:193-197.
- Pi, J., Wookey, P.J., Pittard, A.J. (1991):** Cloning and sequencing of the *pheP* gene, which encodes the phenylalanine-specific transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**:3622-3629.
- Plumbridge, J. (1999):** Expression of the phosphotransferase system both mediates and is mediated by Mlc regulation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**:260-273.
- Pollit, S., Zalkin, H. (1983):** Role of primary structure and disulfide bond formation in β -Lactamase secretion. *J Bacteriol* **153**: 27-32.
- Popkin, P.S., Maas, W.K. (1980)** *Escherichia coli* regulatory mutation affecting lysine transport and lysine-decarboxylase. *J Bacteriol* **141**: 485-492.
- Promega (1994):** Technical manual: Altered sites II *in vitro* mutagenesis systems.
- Rhee, J.E., Rhee, J.H., Ryu, P.Y., Choi, S.H. (2002):** Identification of the *cadBA* operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS Microbiol Lett* **208**: 245-251.
- Rhee, J.E., Kim, K.-S., Choi, S.H. (2005):** CadC Activates pH-Dependent Expression of the *Vibrio vulnificus cadBA* operon at a distance through direct binding to an upstream region. *J Bacteriol* **187**: 7870-7875.
- Rhoads, D.B., Waters, F.B., Epstein, W. (1976):** Cation transport in *Escherichia coli*. VIII. Potassium transport mutants. *J Gen Physiol* **67**: 325-341.
- Richard, H., Foster, J.W. (2004):** *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J Bacteriol* **186**:6032-6041.
- Rigaud, J.-L., Pitard, B., Levy, D. (1995):** Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1231**: 223-246.
- Rosen, B.P. (1971a):** Basic amino acid transport in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **246**: 3653-3662.
- Rosen, B.P. (1971b):** Regulation of lysine transport in *Escherichia coli*. *Fed Prod* **30**: 1061.

- Russ, W.P., Engelman, D.M. (1999):** TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:863-868.
- Sabo, D.L., Boeker, E.A., Byers, B., Waron, H., Fischer, E.H. (1974):** Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *Biochemistry* **13**: 662-670.
- Sal-Man, N., Gerber, D., Bloch, I., and Shai Y (2007):** Specificity in transmembrane helix-helix interactions mediated by aromatic residue. *J Biol Chem* **282**: 19753-19761.
- Samartzidou, H., Delcour, A.H. (1999):** Excretion of endogenous cadaverine leads to a decrease in porin-mediated outer membrane permeability. *J Bacteriol* **181**:791-798.
- Samartzidou, H., Mehrazin, M., Xu, Z., Benedikt, M.J.; Delcour, A.H. (2003):** Cadaverine inhibition of porin plays a role in cell survival at acidic pH. *J Bacteriol* **185**:13-19.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977):** DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Sansonetti, P.J. (2001):** Rapture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote crosstalk. *FEMS Microbiol Rev* **25** 3-14.
- Scatchard, G. (1949):** The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N.Y. Acad Sci* **5**: 660-672.
- Schmidt, T.G.M., Skerra, A. (1994):** One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the „Strep tag“ and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A* **676**: 337-345.
- Schneider, D., Engelman, D.M. (2003):** GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. *J Biol Chem* **278**: 3105-3111.
- Shi, X., Waasdorp, B.C., Bennett, G.N. (1993):** Modulation of acid induced amino-acid decarboxylase gene expression by H-NS in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 1182-1186.
- Shi, X., Bennett, G.N. (1994):** Effects of *rpoA* and *cysB* mutations on acid induction of biodegradative agrinine decarboxylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 7017-7023.
- Siebers, A., Altendorf, K. (1988):** The K⁺-translocating Kdp-ATPase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **178**: 131-140.
- Slonczewski, J.L., Rosen, B.P., Alger, J.R., Macnab, R. M. (1981):** pH homeostasis in *Escherichia coli*: measurement by ³¹P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:6271-5.
- Slonczewski, J.L., Foster, J.W. (1996):** pH-regulated genes and survival at extreme pH, Aus: *Escherichia coli and Salmonella*. Cellular and molecular biology. 2. Ausg., F. Neidhardt (Hrsg.), 1539-1549.

- Snider, J., Gutsche, I., Lin, M., Baby, S., Cox, B., Butland, G., Greenblatt, J., Emili, A., Houry, W.A. (2006):** Formation of a distinctive complex between the inducible bacterial lysine decarboxylase and a novel AAA⁺ ATPase. *J Biol Chem* **281**:1532-1546.
- Snider, J., Houry, W.A. (2006):** AAA⁺ ATPases: a novel family of molecular chaperones? *J Struct Biol* **156**:200-209.
- Soksawatmaekhin, W., Kuraishi A., Sakata K., Kashiwagi K., Igarashi K. (2004):** Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **51**: 1401-1412.
- Soksawatmaekhin, W., Uemura, T., Fukiwake, N, Kashiwagi, K., Igarashi, K. (2006):** Identification of the cadaverine recognition site on the cadaverine-lysine antiporter CadB. *J Biol Chem* **281**:29213-29220.
- Steffes, C., Ellis, J., Wu, J., Rosen, B.P. (1992):** The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. *J Bacteriol* **174**: 3242-3249.
- Stern, R., Mehler, A.H. (1965):** Lysyl-sRNA synthetase from *Escherichia coli*. *Biochem Z* **342**:400-409.
- Stim, K.P., Bennett, G.N. (1993):** Nucleotide sequence of the *adi* gene, which encodes the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 1221-1234.
- Stim-Herndon, K.P., Flores, T.M., G.N. Bennett (1996):** Molecular characterization of *adiY*, a regulatory gene which affects expression of the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase (*adiA*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* **142**: 1311–1320.
- Studier, F.W., Moffat, B. (1986):** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Tabor, H., Hafner, E.W., Tabor, C.W. (1980):** Construction of an *Escherichia coli* strain unable to synthesize putrescine, spermidine, or cadaverine: Characterization of two genes controlling lysine decarboxylase. *J Bacteriol* **144**: 952-956.
- Tabor, S., Richardson, C.C. (1985):** A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 1074-1078.
- Takayama, M., Ohyama, T., Igarashi, K., Kobayashi, H. (1994):** *Escherichia coli cad* operon functions as a supplier of carbon dioxide. *Mol Microbiol* **11**: 913-918.
- Tanaka, Y., Kimata, K., Inada, T., Tagami, H., Aiba, H. (1999):** Negative regulation of the *pts* operon by Mlc: mechanism underlying glucose induction in *Escherichia coli*. *Genes Cells* **4**:391-399.
- Tao, K. (1999):** *In vivo* oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **457**: 90-92.

- Taylor, R.K., Miller, V.L., Furlong, D.B., Mekalanos, J.J. (1987):** Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 2833-2837.
- Terwilliger, T.C., Berendzen, J. (1999):** Automated structure solution for MIR and MAD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**: 849-861.
- Tetsch, L., Koller, C., Haneburger, I., Jung, K. (2008):** The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Mol Microbiol* **67**: 570-583.
- Tucker, D.L., Tucker, N., Conway, T. (2002):** Gene expression profiling of the pH response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 6551-6558.
- van der Veen, S, Hain, T, Wouters, J.A., Hossain, H., de Vos, W.M., Abee, T., Chakraborty, T., Wells-Bennik, M.H. (2007):** The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. *Microbiology* **153**: 3593-3607.
- Verhamme, D.T., Arents, J.C., Postma, P.W., Crielaard, W., Hellingwerf, K.J. (2001):** Glucose-6-phosphate-dependent phosphoryl flow through the Uhp two-component regulatory system. *Microbiology* **147**: 3345-3352.
- Watson, N., Duniak, D.S., Rosey, E.L., Slonczewski, J.L., Olson, E.R. (1992):** Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli cad* operon by external pH. *J Bacteriol* **174**: 530-540.
- Weber, K., Osborn, M. (1969):** The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**: 4406-4412.
- White, S., Tuttle, F.E., Blankenhorn, D., Dosch, C., Slonczewski, J.L. (1992):** pH dependence and gene structure of *inaA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 1537-1543.
- Whittaker, C.A., Hynes, R.O. (2002):** Distribution and evolution of von Willebrand/Integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Molecular Biology of the Cell* **13**: 3369-3387.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., Lin, L.N. (1989):** Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* **179**: 131-137.
- Yang, Y., Isberg, R.R. (1997):** Transcriptional regulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* pH 6 antigen adhesin by two envelope-associated components. *Mol Microbiol* **24**: 499-510.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985):** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Zheng, M., Aslund, F., Storz, G. (1998):** Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation.
- Zilberstein, D., Agmon, V., Schuldiner, S., Padan, E. (1984):** *Escherichia coli* intracellular pH, membrane potential, and cell growth. *J Bacteriol* **158**: 246-252.

Danksagung

- ☉ Zuerst möchte ich mich herzlichst bei Prof. Dr. Kirsten Jung für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Vergabe dieses interessanten Themas bedanken. Durch ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfe bei der Versuchsplanung wurde diese Arbeit erst ermöglicht. Außerdem möchte ich ihr für die Möglichkeit danken, an wissenschaftlichen Tagungen teilzunehmen und diese Arbeit in Kooperation mit anderen Wissenschaftlern durchzuführen.
- ☉ Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei den Kooperationspartnern vom Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München, Prof. Dr. Arne Skerra und Dr. Andreas Eichinger für die Zusammenarbeit bei der Kristallisation von CadC. Joseph Danzer möchte ich in diesem Zusammenhang für seine Hilfe bei der Gelfiltration danken.
- ☉ Prof. Dr. Ulrich Gerland und Georg Fritz vom Institut für Theoretische Physik der Universität zu Köln danke ich für die Erstellung des mathematischen Modells, Georg vor allem für das Korrekturlesen des Modellierungs-Teils.
- ☉ Bei Prof. Luis Moroder vom Max-Planck-Institut für Biochemie (Forschungsgruppe Bioorganische Chemie) bedanke ich mich für die Möglichkeit, die ITC-Messungen durchzuführen. Frau Elisabeth Weyher-Stingl gilt mein Dank für ihre Hilfe bei den Messungen.
- ☉ Ebenso gilt mein Dank den „Osnabrückern“ Dr. Ralf Heermann, Dr. Torsten Pirch, Dr. Arnim Weber und Christoph Küper (mittlerweile Dr. Küper) für die Aufnahme der „Neuen“ aus München. Christoph möchte ich besonders für die Einführung ins Cad-System danken.
- ☉ Mein besonderer Dank gilt auch Korinna Burdack für ihre Unterstützung bei zahlreichen Versuchen, insbesondere bei den Fermenterversuchen und den Transkriptionsanalysen. Ohne Korinna gäbe es wesentlich weniger Resultate, deshalb „Danke schön“. Außerdem danke ich allen „Mitarbeitern des Cad-Systems“ für eine tolle Zusammenarbeit, hierzu zählen Dr. Larissa Tetsch, meine ehemaligen Diplomanden Alexandra Dönhöfer und Tobias Kraxenberger (mittlerweile Mit-Doktorand) und meine ehemalige Praktikantin und „Nachfolgerin bei der Kristallisation“ Ina Haneburger.
- ☉ Ein ganz herzliches „Danke schön“ auch an meine Mit-Doktoranden Claudia Anetzberger, Günther Gabriel, Stephanie Kögl, Tina Odenbach und Nina Stambrau für jede Menge Spaß im Laufe der Zeit, außerdem danke ich auch den TA's Simone Holpert, Ursula Holter und Sonja Kroll für ihre Unterstützung.
- ☉ Ein herzliches „Danke Schön“ auch an alle ehemaligen und jetzigen Diplomanden und Praktikanten, die immer für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben, besonders auch „Danke“ an Hr. Prof. Jung und seiner AG, vor allem Daniel für die Bereitstellung von PutP.
- ☉ Vielen Dank auch an Prof. Dr. Dirk Schüler für die Begutachtung dieser Arbeit.
- ☉ Zu guter Letzt gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christiane Koller
Geburtsdatum: 25.05.1974
Geburtsort: München
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1981-1985: Besuch der Grundschule an der Waldmeisterstraße in München
1985-1994: Besuch des Städt. Sophie-Scholl-Gymnasiums in München
1994: Abitur

Berufliche Ausbildung:

Sept. 1994-Juli 1996: Besuch der Berufsschule für Arzthelferinnen in München
Juli 1996: Abschlussprüfung vor dem Prüfungsausschuss der Bayerischen Landesärztekammer
Oktober 1996: Beginn des Studiums der Biologie an der LMU München
WS 1998/99: Diplom-Vorprüfung in den Fächern Biologie, Chemie und Physikalische Grundlagen für Biologen
2001: Diplom-Hauptprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie, medizinische Mikrobiologie und Pharmakologie/Toxikologie
Januar 2002 bis Dezember 2002: Diplomarbeit am Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie, der LMU München unter Leitung von Prof. Dr. Volker Müller mit dem Titel „Physiologische, molekulare und energetische Untersuchungen zur Rolle von Chlorid in unterschiedlichen

Stämmen des moderat halophilen Bakteriums *Halobacillus halophilus*“

Februar 2003 bis

Dezember 2003: Mitarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Müller am Department Biologie I, Bereich Mikrobiologie, der LMU München

Promotion:

seit April 2004: Promotion an der Fakultät für Biologie der LMU München unter Leitung von Prof. Dr. Kirsten Jung

Publikationen:

Saum, S.H, Roessler, M., Koller, C., Sydow, J.F., Müller, V. (2007): Glutamate restores growth but not motility in the absence of chloride in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*. *Extremophiles* **11**: 711-717.

Tetsch, L., Koller, C., Haneburger, I., Jung, K. (2008): The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Mol Microbiol* **67**:570-583.

Fritz, G., Koller, C., Burdack, K., Gerland, U., Jung, K.: Functional constraints of molecular parts shape network topology in a bacterial stress response system. *Manuskript in Vorbereitung*

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Christiane Koller

München, Februar 2008

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe und dass ich nicht ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Christiane Koller

München, Februar 2008