

**Funktionelle Untersuchung der Sensorkinase KdpD
von *Escherichia coli* mit Hilfe verschiedener
KdpD-Deletionsmutanten**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

Fakultät Naturwissenschaften

Institut für Mikro- und Molekularbiologie
der Universität Hohenheim

vorgelegt von
Marina Constanze Rothenbücher
aus Singen/HTW

2007

Darin besteht das Wesen der Wissenschaft. Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte. Dann sieht man nach, ob es der Fall ist und im allgemeinen ist es nicht der Fall.

Bertrand Russell (1872-1970), brit. Philosoph u. Mathematiker, 1950

*Diese Arbeit widme ich in tiefer Dankbarkeit
meinen Eltern!*

Danksagung

Diese vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Andreas Kuhn am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim angefertigt.

Herrn Prof. Kuhn danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut, seine Betreuung und für die Bereitstellung des interessanten Themas.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sandra Facey für die freundschaftliche und kompetente Betreuung, die fachlichen Diskussionen und das unermüdliche Korrekturlesen.

Frau S. Krauss danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und gute Arbeitsatmosphäre.

Bei Frau Dr. Elke Dian möchte ich mich für die seelisch und moralische Unterstützung bedanken.

Ich bedanke mich bei Prof. Bernd Bukau und Mitarbeitern vom Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg für die massenspektrometrische Untersuchung meiner Proben.

Für die Bereitstellung des KdpD-Antikörpers bedanke ich mich bei Frau Dr. K. Jung und Prof. K. Altendorf der Universität Osnabrück.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen bedanke ich mich für die Zusammenarbeit, die Diskussionen und die Hilfsbereitschaft.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die Förderung und Unterstützung meines Studiums. Sie haben meine Pläne und Ziele stets befürwortet und mich in meinen Vorhaben unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Kdp-System.....	3
1.1.1 Die Komponenten des Kdp-Systems	3
1.1.2 Die Sensorkinase KdpD	6
1.1.3 Model der Siganltransduktion von KdpD	9
1.1.4 Stimulus	14
1.2 Stand der Forschung	16
1.3 Aufgabe	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Geräte.....	17
2.2 Material.....	19
2.2.1 Säulen- und Batchmaterial	19
2.2.2 Materialien zur Filmentwicklung.....	20
2.2.3 Membranen.....	20
2.2.4 Chemikalien und Enzyme	20
2.2.4.1 Chemikalien	20
2.2.4.2 Enzyme	22
2.2.4.3 Kits.....	23
2.2.5 Antikörper	23
2.2.6 Kulturmedien	24
2.2.7 Puffer	25
2.2.8 Bakterienstämme.....	28
2.2.8.1 <i>E. coli</i> XL-1 blue	28
2.2.8.2 <i>E. coli</i> C41(DE3)	28
2.2.8.3 <i>E. coli</i> M15 (pREP4)	28
2.2.8.4 <i>E. coli</i> MC1061	29
2.2.8.5 <i>E. coli</i> HAK006	29
2.2.8.6 <i>E. coli</i> TKV2208.....	29
2.2.8.7 <i>E. coli</i> HJM114	29
2.2.9 Plasmide	29
2.2.9.1 pT7-7.....	29
2.2.9.2 pBAD Vektoren pBAD18 und pBAD33	30
2.2.9.3 pQE30.....	32
2.2.9.4 pET16b	33
2.2.10 Antibiotika	34
2.3 Methoden.....	35
2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Miniprep).....	35
2.3.1.1 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	35
2.3.2 Restriktionsendonukleasen und Restriktionsspaltung.....	36

2.3.2.1	Restriktionsendonukleasen	36
2.3.2.2	Restriktionsspaltung	36
2.3.3	Agarosegelelektrophorese	36
2.3.3.1	Herstellung von Agarosegelen.....	37
2.3.3.2	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	37
2.3.4	Ligation	38
2.3.5	Transformation.....	38
2.3.5.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	38
2.3.5.2	Transformation kompetenter Zellen.....	38
2.3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.3.6.1	Reinigung des PCR-Produktes.....	40
2.3.7	QuikChange-Reaktion	40
2.3.8	DNA-Sequenzierung.....	41
2.3.8.1	Primer	42
2.3.8.2	Herstellung von Sequenziergelen.....	43
2.3.8.3	Durchführung der Sequenzierung.....	44
2.3.8.4	Elektrophorese	45
2.3.9	Herstellung der KdpD-Konstrukte	45
2.3.9.1	pMR14 (KdpD/3-Tag-4).....	47
2.3.9.2	pMR22 (KdpD+ <i>Bam</i> H1)	48
2.3.9.3	pMR16 (KdpD/1-Tag-2).....	48
2.3.9.4	pMR24 (KdpD-C-His ₆).....	49
2.3.9.5	pMR10 (N3-Tag-4C) und pMR18 (N1-2C).....	49
2.3.9.6	pMR20 (KdpD/3412)	50
2.3.9.7	pMR32 (H4+C).....	51
2.3.9.8	pMR36 (H4+C+RR).....	51
2.3.9.9	pMR43 (C494-894).....	53
2.3.9.10	pMR44 (C499-894).....	53
2.3.9.11	Kontrolle der KdpD-Konstrukte.....	54
2.3.10	β -Galaktosidase-Nachweis.....	55
2.3.11	Natriumcarbonat-Methode	55
2.3.12	SDS-Page.....	56
2.3.12.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	56
2.3.12.2	Coomassie-Färbung.....	57
2.3.13	Westernblot (Immunoblot).....	58
2.3.13.1	Westernblot semidry.....	58
2.3.13.2	ECL.....	59
2.3.14	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	60
2.3.14.1	Arabinose-Induktion von Proteinen.....	60
2.3.14.2	TCA-Fällung	60
2.3.14.3	Expression von KdpD-C	60
2.3.14.4	Expression von KdpD.....	61
2.3.15	Solubilisierung von Membranproteinen	62
2.3.15.1	Solubilisierung von KdpD-C.....	62
2.3.15.2	Solubilisierung von KdpD	63
2.3.16	Proteinreinigung.....	63
2.3.16.1	Reinigung von KdpD-C.....	63
2.3.16.2	Reinigung von KdpD.....	64
2.3.16.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	65
2.3.17	Blue Native Gel	65
2.3.17.1	Herstellung des Blue Native Gels	66
2.3.17.2	Vorbereitung der Proben	66
2.3.17.3	Elektrophorese	67
2.3.17.4	Westernblot.....	67
2.3.17.5	2D-Gelelektrophorese des Blue Native Gels	68

3. Ergebnisse	69
3.1 KdpD-Konstrukte für die folgenden Versuche.....	69
3.2 Komplementationstest	70
3.2.1 In flüssigem K0,1-Medium.....	71
3.2.2 Auf festem K0,1-Medium.....	72
3.3 Wachstumskurve der KdpD-Konstrukte.....	72
3.4 β -Galaktosidase-Nachweis.....	74
3.4.1 Aktivität der KdpD-Konstrukte mit 4 Helices.....	74
3.4.2 Aktivität der KdpD-Konstrukte mit 2 Helices.....	76
3.4.3 Aktivität der KdpD-Konstrukte mit einer oder keiner Helix.....	78
3.5 Membranlokalisierung der KdpD-Konstrukte	80
3.6 β -Galaktosidase-Nachweis bei unterschiedlichen Ionenkonzentrationen.....	82
3.6.1 Reaktion des abgeschalteten KdpD auf eine Erhöhung des osmotischen Drucks.....	82
3.6.2 KdpD bei erhöhter Ionenkonzentration in Abhängigkeit zur KCl-Konzentration	84
3.6.3 Vergleich der Aktivierung von KdpD und KdpD-C bei erhöhter Ionenkonzentration zur K^+ -Limitierung	85
3.6.4 Aktivierung des KdpD Wildtyp im Vergleich zu KdpD-C und C499-894 ...	87
3.6.5 Inaktivierung des KdpD Wildtyp im Vergleich zu KdpD-C und C499-894...	89
3.7 Reinigung von KdpD-C.....	91
3.7.1 Expression von KdpD-C in <i>E. coli</i> M15 (pREP4).....	91
3.7.2 Solubilisierung.....	91
3.7.3 Proteinreinigung.....	91
3.8 Reinigung von KdpD.....	94
3.8.1 Expression von KdpD in <i>E. coli</i> C41(DE3)	94
3.8.2 Solubilisierung.....	94
3.8.3 Proteinreinigung.....	95
3.9 Vergleich der coeluierten Banden.....	96
3.10 Vergleich der Reinigung von KdpD und KdpD-C mit einer Kontrolle	97
3.11 Massenspektrometrische Untersuchung der coeluierten Proteinbanden.....	99
3.12 Native Gelelektrophorese zur Untersuchung der Komplexbildung	100
3.12.1 Blue Native Gel	100
3.12.2 Blue Native Gelelektrophorese	100
3.12.3 2D-Gelelektrophorese der nativen Komplexe	101

4. Diskussion	104
4.1 Wachstumstest im Minimalmedium	105
4.2 Wachstumskurve der KdpD-Konstrukte.....	105
4.3 Bestimmung und Vergleich der β -Galaktosidase Aktivität	106
4.3.1 KdpD-Konstrukte mit 4 transmembranen Helices	106
4.3.2 KdpD-Konstrukte mit 2 transmembranen Helices	108
4.3.3 KdpD-Konstrukte mit einer oder keinen transmembranen Helices.....	110
4.4 Das KdpD-Konstrukt C499-894 ist ein K^+ -Sensor.....	113
4.5 KdpD ein Osmosensor?.....	114
4.6 Signaltransduktion von KdpD	116
5. Zusammenfassung.....	122
6. Literaturverzeichnis	124
7. Anhang.....	134
7.1 Abkürzungen.....	134
7.2 Aminosäuren.....	137
7.3 Sequenz von KdpD	138

1. EINLEITUNG

Die Kationen Natrium und Kalium sind an den unterschiedlichsten Vorgängen in der Zelle beteiligt und übernehmen wichtige Aufgaben. Während das Natrium-Ion (Na^+) meist aus der Zelle exportiert wird, um einen Natrium-Gradienten aufzubauen, der wiederum die Energie für andere Transportvorgänge liefert, ist das Kalium-Ion (K^+) das am Höchsten konzentrierte Ion (0,2 bis 0,6 M) in der bakteriellen Zelle (Epstein und Schultz, 1965). Dagegen würde sich eine hohe intrazelluläre Natrium-Konzentrationen toxisch auf das Zellwachstum auswirken (Harold und Altendorf, 1974; Walderhaug *et al.*, 1987).

Das K^+ -Ion ist an vielen essentiellen Mechanismen in der Zelle beteiligt, z.B. an der Aktivierung cytoplasmatischer Enzyme (Suelter, 1970), Regulierung des pH-Wertes (Booth, 1985), Genexpression (Sutherland *et al.*, 1986; Giaever *et al.*, 1988) und an der Osmoregulation (Epstein, 1986). Die Osmoregulation ist für die Zelle überlebenswichtig um die positive Differenz zwischen interner und externer Osmolarität (Turgor) bei den unterschiedlichsten Bedingungen aufrecht zu erhalten (Knaysi 1951). Der Turgor wird für das Wachstum und die Zellteilung benötigt und spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellwandausdehnung. Durch die kontrollierte Ansammlung und Abgabe von K^+ -Ionen und organischen Lösungen (z.B. Glutamat, Betain, Prolin und Trehalose) halten Transportsysteme den Turgor auch bei Veränderungen in der externen Osmolarität relativ konstant, z.B. in *Escherichia coli* bei ca. 3 atm (1 atm = 101 kPa) (Epstein 1986). Erhöht sich die Osmolarität, die mit dem Verlust des Turgors einhergeht, reagiert *Escherichia coli* zuerst mit der Anreicherung von K^+ in der Zelle (Csonka 1989, Csonka und Hanson 1991). Die unmittelbar nach einem hyperosmotischen Schock akkumulierten Kalium- und Glutamationen werden im Verlauf der Antwort auf osmotischen Stress durch Trehalose ersetzt (Larsen *et al.*, 1987; Dinnbier *et al.*, 1988). Diese osmotischen Schutzsubstanzen sind gut wasserlöslich, ladungsneutral bei physiologischen pH und gehen keine Interaktion mit cytoplasmatischen Proteinen ein. Sie können daher in hohen Konzentrationen akkumuliert werden, ohne dass sie das elektrostatische Gleichgewicht und damit den Energiestoffwechsel der Zelle beeinflussen (Galinski, 1995; Timasheff, 1998). Neben ihrer Funktion zur Aufrechterhaltung des Turgors

besitzen osmotische Schutzsubstanzen noch weitere protektive Funktionen, indem sie Enzyme und andere Makromoleküle gegen Stressfaktoren wie Temperatur und denaturierende Substanzen wie Harnstoff und Guanidin-HCl schützen (Potts, 1994; Savouré *et al.*, 1997; Record *et al.*, 1998).

Unter normalen Wachstumsbedingungen sind in *Escherichia coli* hauptsächlich konstitutiv exprimierte K^+ -Aufnahmesysteme wie das Trk (transport of K^+) und Kup (K^+ -uptake) für den geregelten K^+ -Einstrom zuständig (Walderhaug *et al.*, 1987) (s. Abb. 1). Das Zwillingssystem (TrkG und TrkH) besitzt für die K^+ -Aufnahme eine mittlere Affinität und eine hohe Transportgeschwindigkeit. Sinkt die extrazelluläre K^+ -Konzentration allerdings unter einen Wert von 2 mM wird die Affinität dieser Aufnahmesysteme unterschritten und die Induktion des Kdp-Systems (K^+ -dependent) erfolgt. Kdp dient als Notfallsystem und besitzt eine sehr hohe Affinität für K^+ ($K_M = 2 \mu M$) (Rhoads *et al.*, 1976; Laimins *et al.*, 1978; Epstein, 1985). Die Energie für die K^+ -Aufnahme entstammt der Hydrolyse von ATP zu ADP (Rhoads und Epstein, 1977).

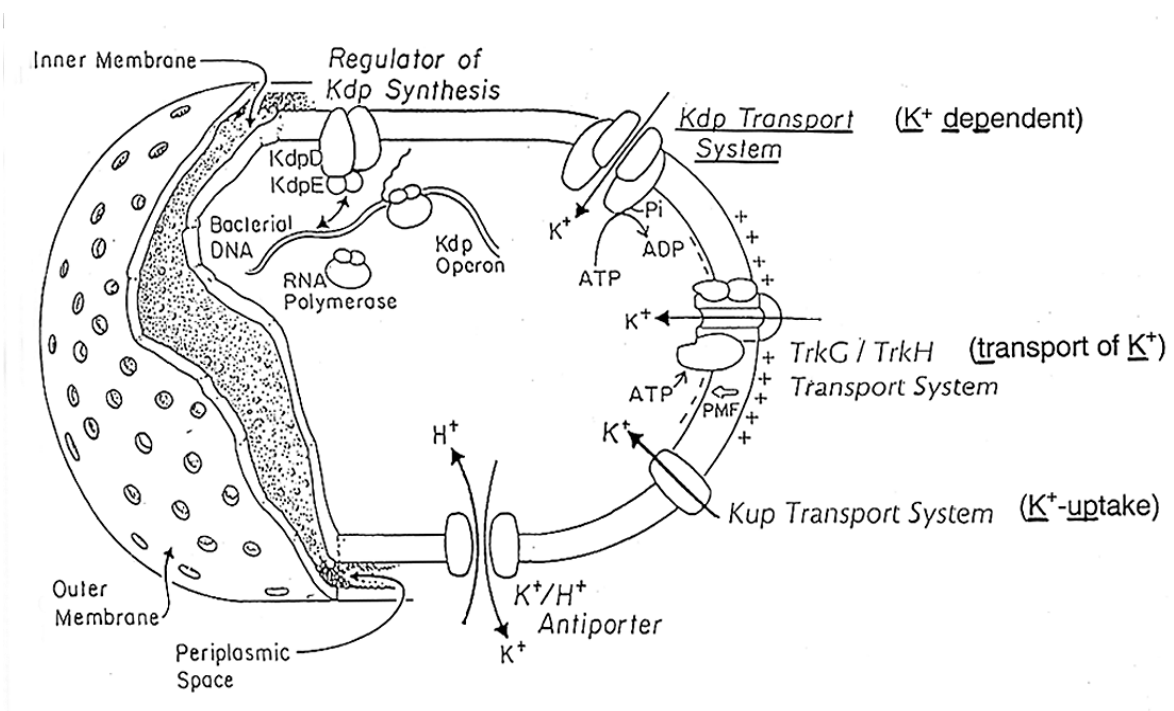


Abb.1 Eine schematische Darstellung des Kalium-Transportes in *Escherichia coli* mit den unterschiedlichen Transportsystemen (verändert nach Helmer, 1982).

1.1 Das Kdp-System

Die Kdp-Gene sind in einem Regulon organisiert, welches bei 16,5 min auf dem *Escherichia coli* Genom liegt und das aus zwei Operons besteht (s. Abb. 2). Das erste Operon enthält die Gene *kdpA*, *kdpB*, *kdpC*, welche die membrangebundenen Strukturproteine des Transportkomplexes codieren (Hesse *et al.*, 1984), und *kdpF*, ein offenes Leseraster vor dem *kdpA*-Gen (Altendorf *et al.*, 1992). Der Promotor liegt vor dem *kdpF*-Gen. Die regulatorischen Gene *kdpD* und *kdpE* sind in dem zweiten Operon organisiert. Der Promotorbereich liegt am Ende des *kdpC*-Gens (Polarek *et al.*, 1992; Walderhaug *et al.*, 1992).

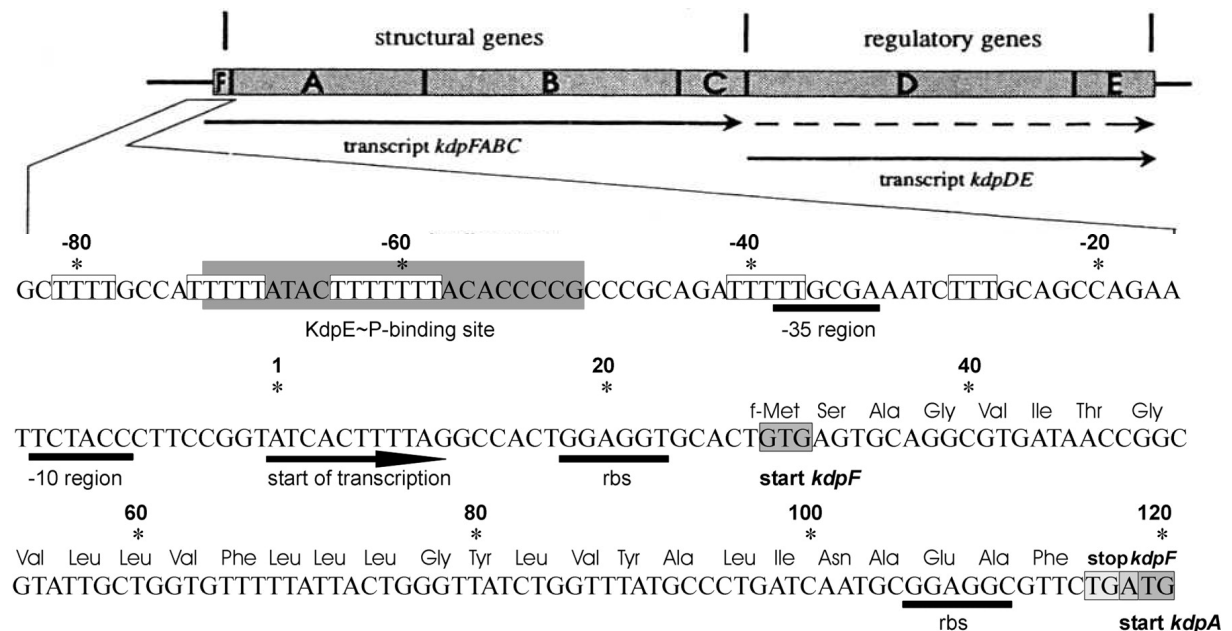


Abb. 2 Schematische Darstellung des Kdp-Regulons mit Struktur- und Regulatorgenen (verändert nach Sugiura *et al.*, 1992).

1.1.1 Die Komponenten des Kdp-Systems

Das Kdp-System besteht aus 6 Komponenten. KdpA, KdpB, KdpC und KdpF sind die membrangebundenen Strukturproteine, die den Transportkomplex bilden. KdpD und KdpE sind für die Regulation des Kdp-Systems verantwortlich. Der KdpFABC-Komplex ist ein hoch spezifisches K⁺-Transportsystem (Altendorf und Epstein, 1996). Es wird den P-Typ ATPasen zugeordnet, allerdings unterscheidet sich dieses System dadurch, dass die katalytische Aktivität (KdpB) und der Ionen-Transport

(KdpA) auf zwei Untereinheiten lokalisiert ist von den üblichen P-Typ ATPasen (Bertrand *et al.*, 2004; Dorus *et al.*, 2001; van der Laan *et al.*, 2002).

KdpA (59 kDa) mit seinen 10 Transmembrandomänen ist mittels einer cytoplasmatischen und einer periplasmatischen Bindungsdomäne sowohl für die Bindung von K^+ -Ionen als auch für deren Transport durch den Kanal zuständig (Buurman *et al.*, 1995; Gaßel und Altendorf, 2001). Studien zur Sequenzhomologie zeigten, dass die periplasmatischen Regionen von KdpA 4 KcsA-ähnlichen selektiven Filterregionen, analog zu dem KcsA-Tetramer, enthält. Das KcsA-Tetramer kann selbstständig einen funktionellen K^+ -Kanal bilden (Bertrand *et al.*, 2004). Auch KdpA kann, abhängig vom cytoplasmatischen Membranpotential, selbstständig die K^+ -Translokation und -Aufnahme vermitteln (Sardesai und Gowrishankar, 2001). Die 4 Filterregionen sind also wichtig für die K^+ -Affinität, haben aber auf die Transportgeschwindigkeit nur einen geringen Einfluss (Dorus *et al.*, 2001).

KdpB (72 kDa) ist die katalytische Untereinheit. Sie bindet ATP und hydrolysiert dieses, wobei ein Acetylphosphat-Intermediat entsteht (Siebers und Altendorf, 1989). Mit der auf diese Weise gewonnenen Energie können pro ATP 2 K^+ -Ionen aufgenommen werden (Epstein *et al.*, 1978). Diese Untereinheit teilt sich mit anderen P-Typ ATPasen 10 homologe Regionen (Serrano, 1988; Gaßler *et al.*, 1999). Sie besitzt zwei kleinere und eine große cytoplasmatische Domäne (zwischen Helix4 und 5) und 7 Transmembrandomänen (Gaßler und Altendorf, 2001). In der cytoplasmatischen Domäne findet wahrscheinlich an dem konservierten Aminosäurerest Asp 307 die Phosphorylierung statt (Siebers und Altendorf, 1989; Puppe, *et al.*, 1992). Eine ATP-induzierte Konformationsänderung von KdpB während des Reaktionszykluses konnte nicht festgestellt werden (Haupt *et al.*, 2004).

Bei KdpC besitzt das 20,5 kDa große Protein nur eine Transmembrandomäne nahe des N-Terminus, wobei der C-Terminus im Cytoplasma liegt (Altendorf *et al.*, 1998). Untersuchungen der löslichen Domäne von KdpC (AS: Asn39 bis Glu190) führten zu einem Modell, bei dem der lösliche Teil von KdpC die Katalyse von KdpB aktiviert (Ahnert *et al.*, 2006). Mutationsversuche an KdpC zeigten, dass nach einer Veränderung dieser Untereinheit das Kdp-System nicht mehr funktionsfähig war

(Epstein und Davis, 1970; Gaßel, 1994). Dies deutet darauf hin, dass KdpC essentiell für die Funktion des KdpFABC-Komplexes ist (Laimins *et al.*, 1981). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass es an dem Assembly des Komplexes beteiligt ist (Gaßler *et al.*, 1999). Die extreme Unempfindlichkeit von KdpC gegenüber Proteasen deutet darauf hin, dass es möglicherweise durch die zwei anderen Untereinheiten abgeschirmt wird (Siebers, 1988).

Auch das kleinste beteiligte Protein, das hydrophobe KdpF, hat nur eine Transmembrandomäne (Altendorf *et al.*, 1998). Das Protein ist 3,1 kDa groß und ist wahrscheinlich für die Stabilisierung des Komplexes *in vitro* zuständig (Gaßler *et al.*, 1999). Eine vergleichbare Funktion wurde für die ϵ -Untereinheit der Methylmalonyl-CoA Decarboxylase aus *Veillonella parvula* gefunden (Huder und Dimroth, 1993). Untersuchungen ergaben, dass KdpF *in vivo* nicht essentiell für die Funktion der Kdp-ATPase ist (Gaßel *et al.*, 1999).

Das KdpE (25 kDa), ein hydrophiles Protein, befindet sich im Cytoplasma (Walderhaug, *et al.*, 1992). Es weist Homologien zu anderen Antwortregulatoren wie OmpR, CreB und PhoB auf (Walderhaug *et al.*, 1992). KdpE wird nach den 3 hochkonservierten Aminosäuren (Asp 9, Asp 52, Lys 101) in der „receiver“-Domäne in die Gruppe der DNA-bindenden Antwortregulatoren eingeteilt. Der Lysin-Rest ragt aus einer „sauren Tasche“ heraus, die von den Aspartat-Resten und einer weiteren sauren Aminosäure gebildet wird (Volz und Matsumara, 1991). Bei der Bindung an die Phosphorylierungsstelle Asp 52 wird dieser verdrängt, was zu einer Konformationsänderung im Antwortregulator führt (Lukat *et al.*, 1991). Die Folge ist eine Aktivitätsänderung, hauptsächlich in der „output“-Domäne, die sich z.B. in der erhöhten DNA-Bindungsaffinität der Transkriptionsaktivatoren zeigt (Rampersaud *et al.*, 1994).

KdpD (98 kDa) wird einer Gruppe von Sensorkinase zugeordnet, die eine N-terminale „input“-Domäne und eine C-terminale „transmitter“-Domäne haben (Parkinson und Kofoid, 1992). Die „input“-Domäne von KdpD weicht von dem üblichen Aufbau der Sensorkinasen ab. Sie ist außergewöhnlich lang und hat 4 Membrandurchgänge in der Mitte von KdpD (Zimmann *et al.*, 1995). In der „transmitter“-Domäne enthält KdpD den in allen Sensorkinasen konservierten His-

Rest 673, der durch einen Stimulus phosphoryliert wird (Sugiura, *et al.*, 1992). Darauf findet ein Phosphotransfer auf das Asp 52 des KdpE-Proteins statt, wodurch die *kdpFABC*-Transkription induziert wird. Die Kalium-ATPasen werden aktiviert und Kalium-Ionen können in die Zelle transportiert werden.

1.1.2 Die Sensorkinase KdpD

Die Sensorkinase KdpD besteht aus 894 Aminosäuren und ist ein vierspänniges Membranprotein, das neben sehr kurzen periplasmatischen Loops (4 und 10 Aminosäuren) zwei große cytoplasmatische Regionen (je ca. 400 AS am N- und C-Terminus) besitzt (Zimmann *et al.*, 1995) (s. Abb. 3). Dabei ist die cytoplasmatische N-terminale Domäne außergewöhnlich lang (Puppe, *et al.*, 1996; Jung, *et al.*, 1998a).

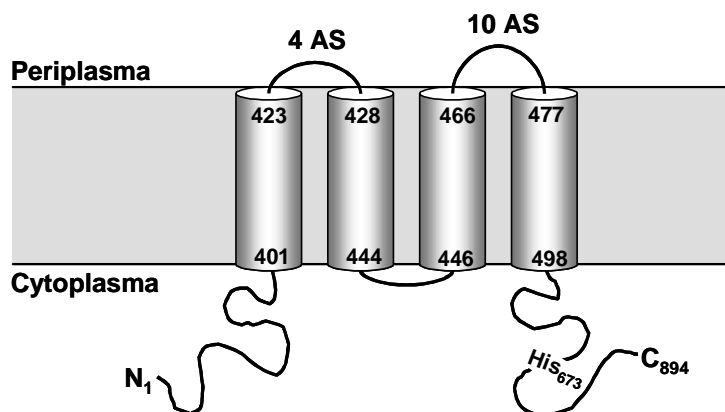


Abb. 3 Sekundärstruktur Model der Sensorkinase KdpD (verändert nach Jung *et al.*, 1997).

Die kalkulierte Masse des KdpD-Monomers beträgt 99,6 kDa. Nach der Reinigung des KdpD-Proteins über eine Nickel-Säule konnten Heermann und seine Mitarbeiter auf dem Gel drei Banden erkennen (Monomer, Dimer, Tetramer). Aufgrund dieser Beobachtung kamen sie zu der Schlussfolgerung, dass die funktionelle Form des KdpD-Proteins ein Homodimer sei und die Kinasereaktion bei „trans“ vorkommen könnte. Das KdpD-Homodimer ändert seinen Status auch bei der Phosphorylierung nicht (Heermann *et al.*, 1998).

Bei den Untersuchungen zum Mechanismus der Membraninsertion von KdpD wurde ein Translationsstop/start in der Mitte des *kdpD*-Gens zwischen Helix2 und Helix3 eingebaut. Dadurch entstanden die beiden Fragmente KdpD-N (AS: 1 bis 448) und KdpD-C (AS: 444 bis 894), welche beide unabhängig von der Sec-Translokase und der YidC-Insertase in die Membran eingebaut werden (s. Abb. 4). Nach dem aktuellen Modell vermittelt jeweils zwei Helices die Membraninsertion. Daher gehört KdpD zu einer Klasse von Membranproteinen, die keine enzymatische Hilfe der bisher bekannten Translokasen für ihre Membraninsertion benötigt (Facey und Kuhn, 2003). Die Zielsteuerung von KdpD an die Plasmamembran findet SRP-vermittelt statt. Dies zeigen Untersuchungen in einem Ffh-Depletions-Stamm, in welchem die Expression des *ffh*-Gens unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren *araBAD*-Promotors steht (Facey und Kuhn, 2004). Diese Ergebnisse führten zu dem Insertionsmodell, das in Abbildung 4 dargestellt ist.

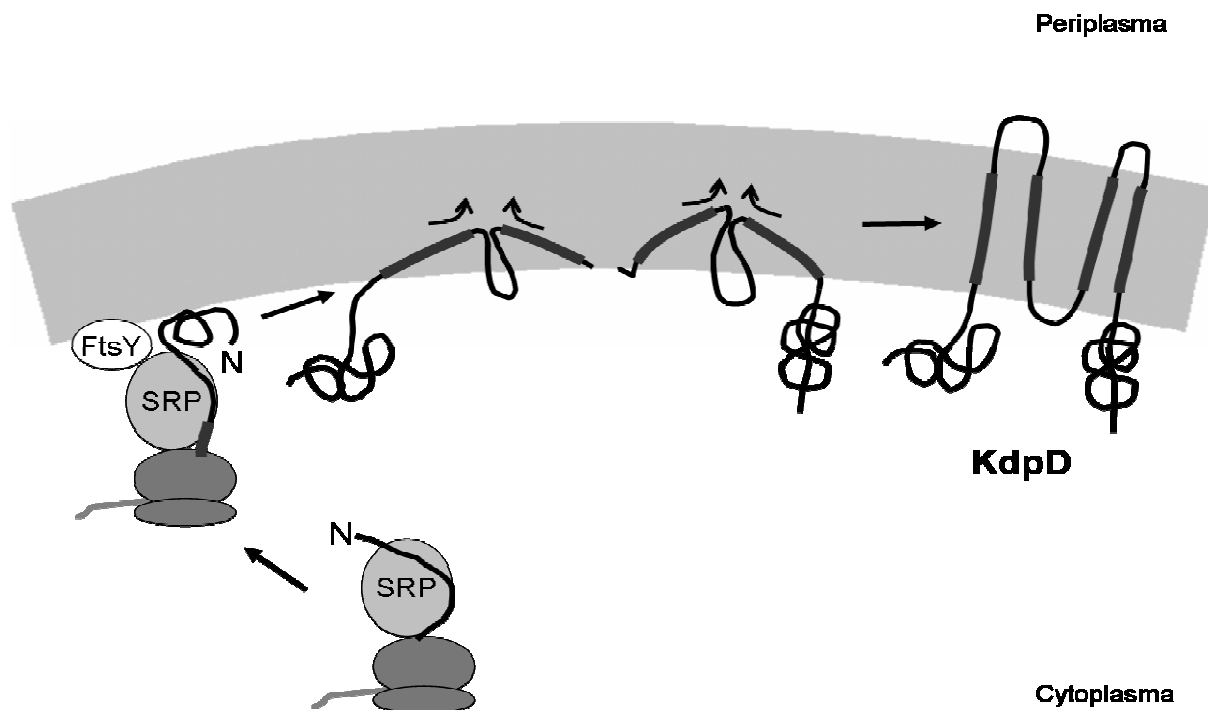


Abb. 4 Model der SRP-vermittelten Membrantranslokation von KdpD (nach Facey und Kuhn, 2004).

KdpD ist ein bifunktionales Enzym, das die Autophosphorylierung durch ATP und die Dephosphorylierung des korrespondierenden Antwortregulators KdpE katalysiert. Die enzymatische Aktivität wurde durch die Verwendung des gereinigten Enzyms *in vitro* demonstriert. Bei der katalytische Dephosphorylierung von KdpE durch KdpD wird als Begleiterscheinung ein anorganisches Phosphat frei (Jung, *et al.*, 1997). Die

Phosphataseaktivität von KdpD nimmt bei Zugabe von ATP oder nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga deutlich zu. Andere Nukleotide haben darauf keine Auswirkung (Jung und Altendorf, 1998a). Durch Deletion der Aminosäuren 12 bis 128 ist die Phosphatase-Aktivität unabhängig von ATP, so dass es wahrscheinlich ist, dass es in dieser Region eine ATP-Bindestelle gibt. Der N-Terminus enthält die ATP-Bindestellen Walker A und B, die eventuell regulierend auf diese Phosphatase-Aktivität wirken (Jung und Altendorf, 1998a; Heermann *et al.*, 2000) (s. Abb. 5). Weitere Untersuchungen am gereinigten KdpD/1-395 zeigten, dass nur die membranassoziierte Form der N-terminale Domäne (KdpD/1-395) fähig war 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ zu binden (Heermann *et al.*, 2000).

Auch bei der Signaltransduktion könnte die lange N-terminale Domäne von KdpD eine große Rolle spielen. Dies konnte durch eine KdpD-Mutante (KdpD/ Δ 12-395), bei der die Aminosäuren 12 bis 395 deletiert wurden, gezeigt werden. Die unregulierte Aktivität von KdpD/ Δ 12-395 konnte wiedererlangt werden, indem die korrespondierenden Gene *kdpD*/ Δ 12-395 und *kdpD*/1-395 zusammen exprimiert wurden (Heermann, *et al.*, 2000). Diese unregulierbare Aktivität kann auch daher kommen, dass die cytoplasmatische N-terminale Domäne anscheinend eine stabilisierende Wirkung auf die Bindung zwischen dem Antwortregulator KdpE und der korrespondierenden DNA-Bindungsstelle hat (Heermann *et al.*, 2003b).

Um mehr über die Signaltransduktion von KdpD zu erfahren wurden Aminosäurereste in der Transmembrandomäne 1 an der Position Cys 409 gegen Ala oder Ser ausgetauscht. Die Ergebnisse zeigten, dass verschiedene Aminosäurereste an der Position 409 den Wechsel zwischen der aktiven und der inaktiven Form der Kinase beeinflussen (Jung *et al.*, 1998). Dass der Austausch einer einzigen Aminosäure einen so starken Effekt hat, kann damit erklärt werden, dass die Aktivierung der Expression sensibel auf Änderungen der Struktur von KdpD reagiert. Diese Änderung der Konformation könnte eine Weiterleitung des Signals zur distalen Region von KdpD, wo die Kinase- und Phosphataseaktivität vermittelt wird, bewirken (Brandon *et al.*, 2000).

Weitere KdpD-Mutanten wurden hergestellt, bei denen Aminosäuren in der Transmembrandomäne 1 und der Aspartatrest 424 in dem ersten cytoplasmatischen

Loop gegen Cystein ausgetauscht wurden. Dabei wurde festgestellt, dass zwar die osmosensorische Funktion, nicht aber die K^+ -sensitive Funktion gestört war. Aufgrund dieser Resultate kamen Stallkamp und Mitarbeiter zu dem Schluss, dass die Transmembrandomäne 1 eine wichtige Funktion bei der osmotischen Regulation von KdpD spielt, nicht aber die K^+ -sensitiven Regulation beeinflusst. Folglich seien die osmotische und K^+ -sensitive Reizwahrnehmung bei KdpD zwei voneinander unabhängige Mechanismen (Stallkamp *et al.*, 2002). Untersuchungen an KdpD-Mutanten, bei denen alle 4 Transmembrandomänen deletiert wurden, zeigten jedoch, dass diese nicht essentiell für die K^+ -sensitive Reizwahrnehmung sind, aber eventuell wichtig für die richtige Positionierung der langen cytoplasmatischen N- und C-terminalen Domänen zueinander sein könnten (Heermann *et al.*, 2003a).

1.1.3 Modelle der Signaltransduktion von KdpD

Die Signaltransduktion in dem Kdp-Systemen ist eine Phosphorylierungskaskade von ATP über die Sensorkinase (KdpD) zum Antwortregulator (KdpE). Ein solches System nennt man Sensorkinase/Antwortregulator-System (Übersichtsartikel Stock *et al.*, 1989; Parkinson und Kofoid 1992). Dieses System ermöglicht der Zelle sich schnell auf häufig schwankende extra- und intrazelluläre Bedingungen einzustellen. *Escherichia coli* besitzt ungefähr 50 solcher regulativen Systeme. Es besteht meistens nicht nur aus zwei Komponenten, sondern aus einem Netzwerk verschiedener Reaktionskreisläufe. Dies wird als universeller Signaltransduktionsmechanismus bezeichnet. Das KdpD/KdpE-System zeigt im Prinzip den konventionellen, molekularen Aufbau eines Sensorkinase/Antwortregulator-Systems. Es wird angenommen, dass in der „input“-Domäne von KdpD drei Regionen für die Aktivität wichtig sind. Erstens eine regulatorische ATP-Bindestelle (Jung und Altendorf, 1998a), zweitens die transmembranen Domänen (Altendorf *et al.*, 1994) und drittens eine Gruppe positiv geladener Aminosäurereste nahe der Transmembrandomäne 4 (Abb. 5; Jung und Altendorf, 1998b). Dieses Cluster positiv geladener Aminosäuren könnte für das Kinase/Phosphatase-Verhältnis von Bedeutung sein (Jung und Altendorf, 1998b).

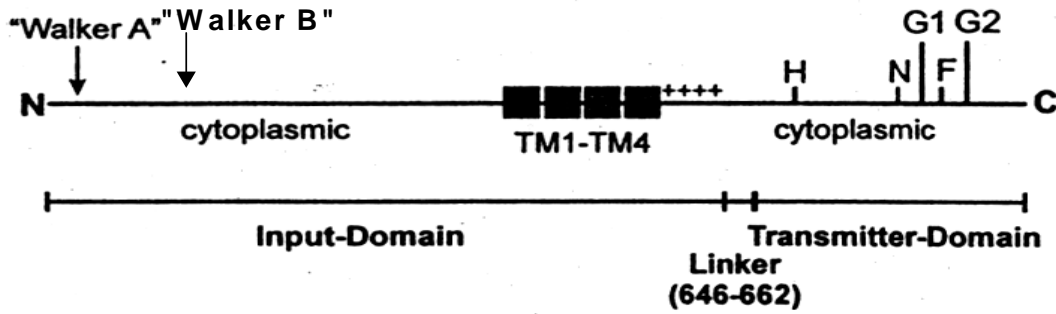


Abb. 5 Schematische Darstellung der Sensorkinase KdpD (verändert nach Heermann *et al.*, 2003a). TM1-TM2: Transmembrandomänen 1 bis 4; H, N, G1, F und G2: charakteristische Sequenzmotive für Sensorkinasen

Die Stimuli, die von der „input“-Domäne wahrgenommen werden, sind wahrscheinlich unterschiedlicher Natur. Die Regulation wird über die Stärke des Signals und die kontrollierte Phosphorylierung des Antwortregulators induziert. Nach dem Modell des Sensorkinase/Antwortregulator-System wird zuerst das „input“-Signal von der „input“-Domäne an die „transmitter“-Domäne weitergeleitet. Dies führt zur Autophosphorylierung der Sensorkinase mit der γ -Phosphatgruppe von ATP an einem konservierten His-Rest in der „transmitter“-Domäne. Dann überträgt die Kinasereaktion die Phosphatgruppe von der Sensorkinase auf einen konservierten Asparagin-Rest des Antwortregulators in der „receiver“-Domäne. Die phosphorylierte „receiver“-Domäne reguliert die Aktivität der nicht konservativen C-terminalen „output“-Domäne des Antwortregulators, die für die spezielle Wechselwirkung mit dem zu regulierenden System verantwortlich ist (s. Abb. 6).

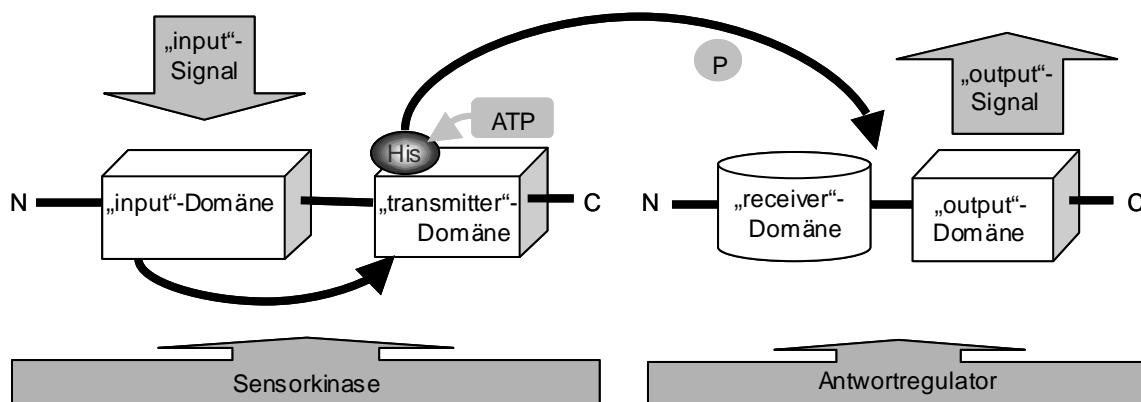


Abb. 6 Schema des modularen Aufbaus und der Funktionsweise von Sensorkinase/Antwortregulator-Systemen (verändert nach Zimmann, 1995; Parkinson und Kofoid, 1992).

Beim Kdp-System könnte somit aufgrund eines Stimulus („input“-Signal) die dimere Sensorkinase KdpD ihre Konformation ändern, wodurch es zur Autophosphorylierung an der Stelle His 673 kommt (Voelkner *et al.*, 1993) (s. Abb. 7). Diese Phosphatgruppe wird auf den cytoplasmatischen Antwortregulator KdpE (Asp 52) übertragen, wodurch dieser in den aktiven Zustand übergeht. Das aktive KdpE (25 kDa) bindet mit gesteigerter Affinität an eine 23 bp umfassende Sequenz stromaufwärts der -35 und -10 Region des *kdpFABC* Promotors. Dadurch wird die Transkription der *kdpFABC*-Gene initiiert (Sugiura *et al.*, 1992; Nakashima *et al.*, 1993).

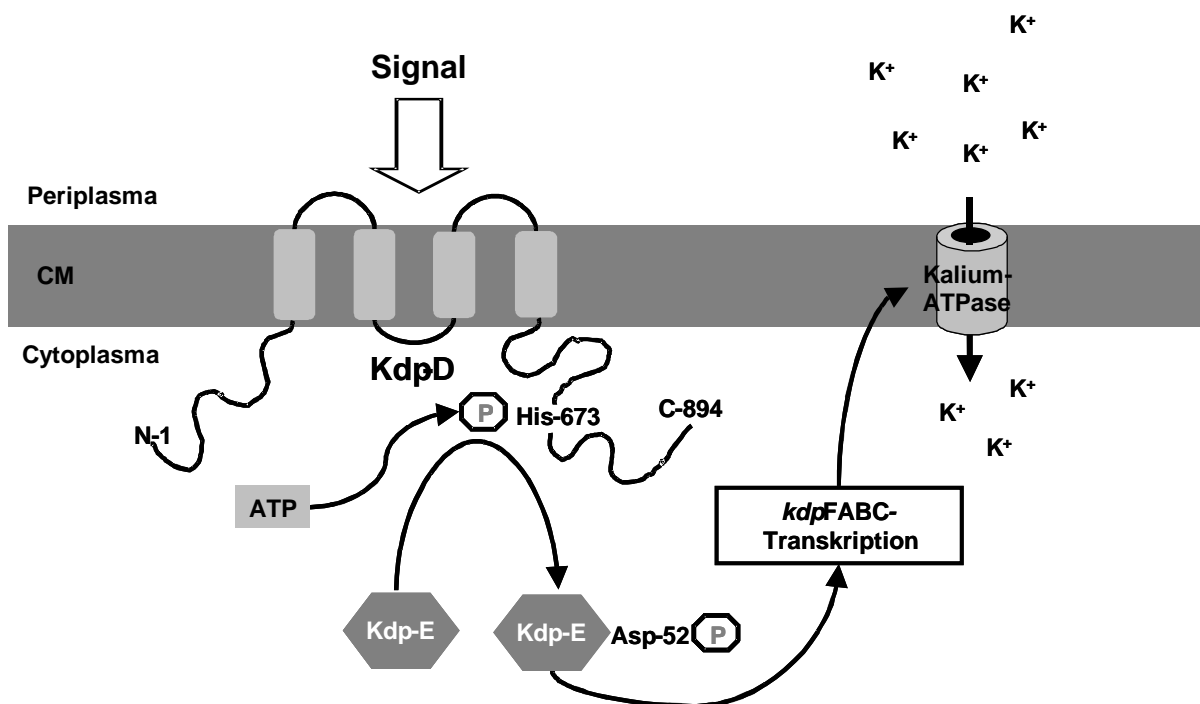


Abb. 7 Modell der Signalkaskade der Sensorkinase KdpD und des Antwortregulators KdpE.

Wie genau der Mechanismus der Signaltransduktion bei dem Kdp-System funktioniert, ist noch nicht klar. Bekannt ist, wie bereits erwähnt, dass die Expression des *kdpFABC*-Operon durch KdpD und KdpE reguliert wird. Sinkt die K^+ -Konzentration, so dass die konstitutiven Transportsysteme den Bedarf der Zelle nicht mehr decken können, wird das Kdp-System aktiviert (Rhoads *et al.*, 1976; Laimins *et al.*, 1978; Epstein, 1985). Da die K^+ -Ionen maßgeblich zur Aufrechterhaltung des Turgors beitragen, postulierten Epstein und Mitarbeiter, dass KdpD auch Turgoränderungen registrieren kann. Dieses Turgormodell wurde dadurch unterstützt, dass bei der Erhöhung der Mediumosmolarität es zur Induktion der

kdpFABC-Operons kommt (Malli und Epstein, 1998). Die Änderungen des Turgors könnten dabei direkt durch die Dehnung der Transmembrandomänen und die daraus folgende Konformationsänderung von KdpD bewirkt werden (Brandon *et al.*, 2000). KdpD könnte demzufolge durch zwei Stimuli aktiviert werden, Begrenzung der K⁺-Konzentration und Erhöhung der Osmolarität (Jung und Altendorf, 1998a). Dabei wird angenommen, dass sich das K⁺-Signal auf die interne K⁺-Konzentration und/oder den K⁺-Aufnahmeprozess bezieht (Frymier *et al.*, 1997). Dagegen ließen die Ergebnisse der Untersuchungen anderer Gruppen die Vermutung zu, dass eher die externe K⁺-Konzentration als Stimulus wirkt (Asha und Gowrishankar, 1993; Roe *et al.*, 2000).

Diese Erkenntnisse führten zu einem Modell der Reizwahrnehmung und Signaltransduktion des Kdp-Systems (Jung *et al.*, 2000) (s. Abb. 8). Bei diesem Modell katalysiert KdpD verschiedene Reaktionen. Zuerst die Autophosphorylierung, dann den Transfer der Phosphatgruppe zu KdpE und schließlich die Dephosphorylierung von KdpE-P. Die Autophosphorylierung wird durch hohe K⁺-Konzentrationen inhibiert und durch die intrazelluläre Ionenstärke stimuliert. Es wurde angenommen, dass Salze im Außenmedium auch die Autophosphorylierung aktivieren können, wogegen Zucker kaum oder gar keinen Effekt zeigten (Sutherland *et al.*, 1986; Asha and Gowrishankar, 1993). Jung *et al.* kommen jedoch bei ihren weiteren Untersuchungen zu dem Schluss, dass die Autophosphorylierungs-Aktivität von KdpD nicht alleine durch Änderungen des Turgors beeinflusst wird (Jung *et al.*, 2000).

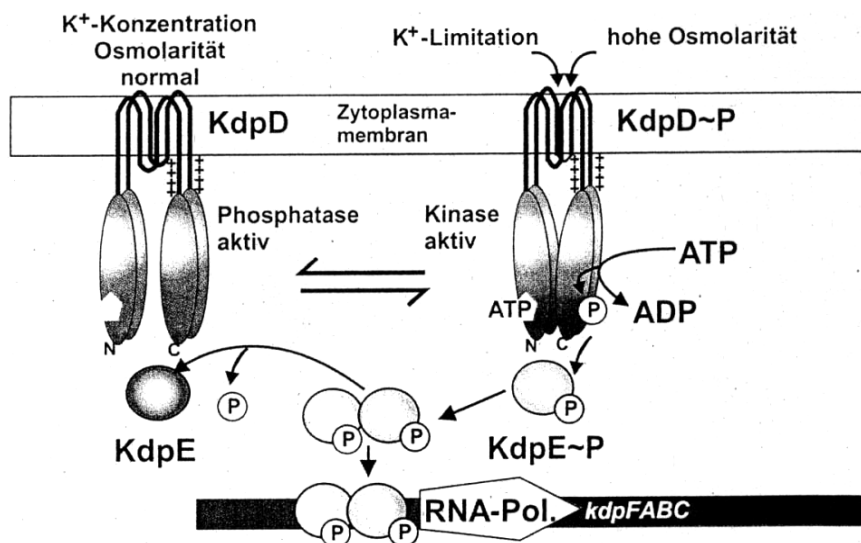


Abb. 8 Modell der Reizwahrnehmung und Signaltransduktion des Kdp-Systems (nach Jung *et al.*, 2000).

Jung und Altendorf trugen alle Studien zur Natur des Stimulus, der auf KdpD wirkt, zusammen und überarbeiteten damit ihr Modell der Signaltransduktion von KdpD (s. Abb. 9). Sie nahmen an, dass hauptsächlich intrazelluläre Parameter, die die Konditionen in der Zelle verändern, die Aktivität von KdpD beeinflussen (Jung und Altendorf, 2002). KdpD ist ein Dimer und die Autophosphorylierungsreaktion ist ein Resultat einer *trans*-Phosphorylierung zwischen zwei Monomeren. Während dieser Reaktion verändert KdpD seinen oligomeren Status nicht. Das Gleichgewicht zwischen der Autophosphorylierung und der Phosphataseaktivität wird vermutlich durch einen elektrostatischen Switch-Mechanismus reguliert. Die Phosphatgruppe von KdpD wird schnell zu dem, während der Phosphorylierung als Dimer vorkommenden, KdpE transferiert. Ein Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration, der auch nach einem osmotischen Schock zu beobachten ist, kann die Phosphataseaktivität beeinflussen. Es wurde beobachtet, dass Salze, die zum Medium zugegeben wurden, ebenso die Phosphataseaktivität beeinflussen können. Wahrscheinlich dadurch, dass die Salzkristalle die Interaktion der Domänen mit der Phospholipid-Membran störten (Jung und Altendorf, 2002).

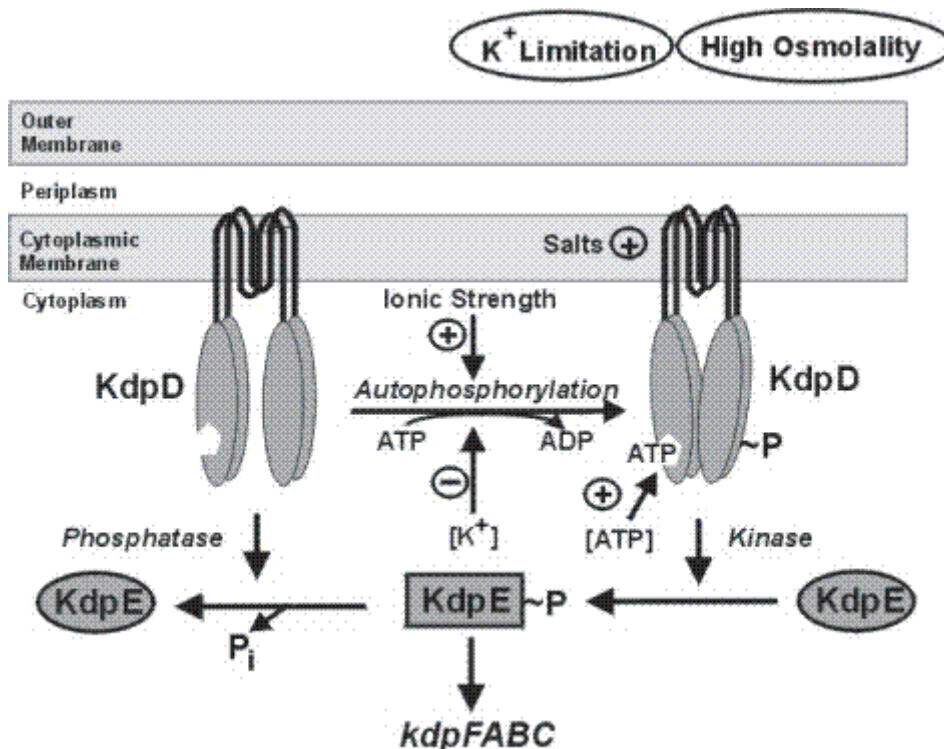


Abb. 9 Erweitertes Modell der Reizwahrnehmung und Signaltransduktion des Kdp-Systems. Es beschreibt strukturelle Eigenheiten von KdpD und KdpE, die für die Reizwahrnehmung und Signaltransduktion wichtig sind. Zusätzlich werden die Effekte auf die enzymatische Aktivität von KdpD gezeigt (nach Jung und Altendorf, 2002).

Untersuchungen an KdpD-Mutanten, bei denen alle 4 Transmembrandomänen deletiert wurden, haben gezeigt, dass diese nicht essentiell für die K^+ -sensitive Reizwahrnehmung sind. Es wurde angenommen, dass sie eventuell wichtig für die richtige Positionierung der langen cytoplasmatischen N- und C-terminalen Domänen zueinander sein könnten (Heermann *et al.*, 2003a). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde das Modell der Reizwahrnehmung und Signaltransduktion von Jung und Altendorf (2002) ergänzt (s. Abb. 10). Bei diesem Modell sind die cytoplasmatische N- und C-terminale Domäne die Hauptverantwortlichen für die Reizwahrnehmung. Die Transmembrandomänen übernehmen die Aufgabe die cytoplasmatischen Domänen korrekt zueinander zu positionieren. Im aktiven Zustand wird der Phosphattransfer auf KdpE durch eine Konformationsänderung der cytoplasmatischen Domänen zueinander begleitet. Ist die Phosphorylierung von KdpE beendet, wird die Sensorkinase inaktiv, indem sich die cytoplasmatischen Domänen voneinander entfernen (Heermann *et al.*, 2003a).

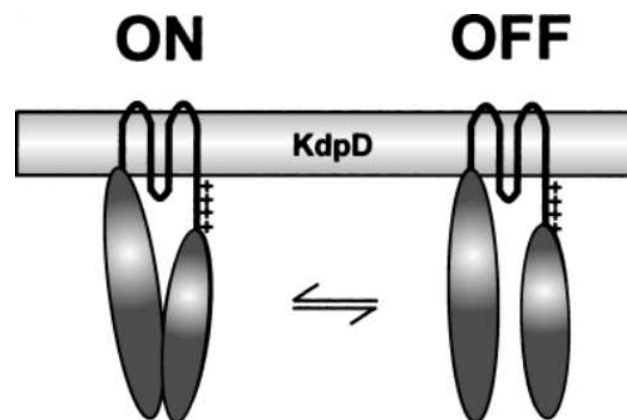


Abb. 10 Modell des aktiven und inaktiven Zustandes von KdpD bei der Signaltransduktion (verändert nach Heermann *et al.*, 2003a).

1.1.4 Stimulus

Bis jetzt weiß man sehr wenig über den direkten Stimulus der die Sensor-Kinase KdpD reagiert und der molekulare Mechanismus wird widersprüchlich diskutiert. Dabei gehen ältere Hypothesen davon aus, dass KdpD ein Turgorsensor ist (Malli und Epstein, 1998) oder durch eine sinkende K^+ -Konzentration bzw. durch eine zunehmende Osmolarität aktiviert wird (Sugiura *et al.*, 1994). Der abnehmende Tugordruck soll, bedingt durch niedrigere K^+ -Konzentrationen im Außenmedium,

oder einem damit zusammenhängenden Effekt, induzierend auf die *kdp*-Genexpression wirken und stimuliert die Aktivität der synthetisierten Kdp-Transportkomplexe (Epstein, 1986). Auch das Modell von Sugiura *et al.* beschreibt diese zwei Stimuli zu Aktivierung von KdpD: K⁺-Limitierung und Erhöhung des osmotischen Drucks (Sugiura *et al.*, 1994).

Als mögliche Parameter für den primären Stimulus wurden auch ein Wechsel in der elektrostatischen Interaktion, eine Änderung der intrazellulären ATP- und/oder Kalium-Konzentration oder der unterschiedliche Membrandruck beschrieben (Heermann, *et al.*, 2000). Durch die Ionenverteilung außerhalb und innerhalb der Zelle kommt der unterschiedliche Membrandruck zustande. Sind z.B. im Außenmedium weniger Ionen als in der Zelle, versucht die Zelle durch die Aufnahme von Wasser die Konzentration auszugleichen. Durch das Anschwellen der Zelle nimmt der Membrandruck zu, wodurch sich die Konformation von KdpD ändert, und dies könnte ein Auslöser für die *kdpFABC*-Expression sein (Heermann, *et al.*, 2000).

Basierend auf den Resultaten, die bei der Untersuchung mit Right-side-out Membranvesikeln durchgeführt wurden, wurde von Jung *et al.* ein neues Modell entwickelt. Dabei wird die KdpD Autophosphorylierungsaktivität direkt von der intrazellulären K⁺-Konzentration und der Ionenstärke beeinflusst. Wobei die K⁺-Konzentration einen inhibierenden und die Ionenstärke einen aktivierenden Einfluss hat (Jung *et al.*, 2000). Auch durch Zugabe von externem Cs⁺ kann die *kdpFABC* Expression signifikant beeinflusst werden, wenn man gleichzeitig die intrazelluläre K⁺-Konzentration senkt, was von KdpD registriert wird. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Sensorkinase KdpD fähig ist multiple Signale zu verarbeiten (Jung *et al.*, 2001). Die Entdeckung, dass auch der cytoplasmatische Thiol-Oxidationsstatus und das Nukleoid-Protein H-NS die *in vivo* Expression des *kdp*-Operons signifikant beeinflussen können, scheint diese Annahme zu bestätigen (Sardesai und Gowrishankar, 2001).

1.2 Stand der Forschung

Durch den Einbau eines Translationsstop/start in der Mitte des *kdpD*-Gens kann das KdpD in 2 unabhängigen, zweispännigen Proteinfsegmenten (KdpD-N und KdpD-C) exprimiert werden (Facey und Kuhn, 2003). Bei der Untersuchung ihrer Funktionalität wurde festgestellt, dass der C-terminale Teil mit den Helices 3 und 4 (KdpD-C) aktiv ist. Bei Erhöhung der K^+ -Konzentration im Medium reduziert KdpD-C die Aktivität, was darauf hinweist, dass KdpD-C die K^+ -Änderungen im Medium registrieren kann. Bei dieser KdpD-Mutante KdpD-C ist die sogenannte „input“-Domäne, die aus der cytoplasmatischen N-terminalen Domäne und den 4 Helices bestehen soll, stark verkürzt. Weitere KdpD-Konstrukte, bei denen Teile deletiert oder vertauscht wurden, wurden hergestellt und ihre Funktion untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die N-terminale Domäne nicht essentiell für die Funktion von KdpD ist (Rothenbücher, 2000).

1.3 Aufgabe

Bei dieser Arbeit wird der Mechanismus der Signaltransduktion des Kdp-Systems untersucht. Dabei soll die Bedeutung des Membranteils von KdpD für die Signalrezeption und -weiterleitung geklärt werden. Anhand immer größere Deletionen wird untersucht, wo die Signalwahrnehmung stattfindet. Neue KdpD-Konstrukte, mit zum Teil drastischen Deletionen, werden hergestellt und ihre Funktionalität mit Hilfe verschiedener Stimuli getestet (K^+ , NaCl, Zucker). Dabei wird auch die Membranlokalisation und deren Auswirkung auf die Funktion der KdpD-Konstrukte untersucht. Letztendlich soll der essentielle Teil von KdpD für die Signaltransduktion bestimmt werden, um die kleinste funktionelle Einheit von KdpD zu finden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

Agarosegelkammer

- Owl Separation System Easy Cast Elektrophoresis System Model # B1A;
- The EasyCast™ Electrophoresis System, Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Große Agarosegelkammer wurde hergestellt in der Werkstatt der Universität Hohenheim, Deutschland

Autoklaven

- H + P Varioklav Dampfsterilisator Typ 75S und 135S, H + P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland

Bildaufnahmesystem

- Digitales Bildaufnahmesystem, Digital Science™ Kodak
- Image Station 440 CF mit Software 1D Version 3.5, Eastman Kodak, Company, NY, USA

Blot-Kammer (semidry)

- Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
- peQLab, Biotechnologie, England

Elektrophoresekammer

- Vertical Dual Gel Mini Electrophoresis Unit, (SDS-PAGE) von Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- Hoefer Electrophoresis Unit SE600 Series von Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA

Feinwaage

- Mettler Toledo AG 204, Mettler Toledo AG, Greifensee, Schweiz; Sartorius 1264MP, 2444, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, Deutschland

French Press

- French Pressure Cell Press, American Instrument Company, MA, USA

Geltrockner

- Gel Dryer Modell 583 mit Hydro Tech. Vacuum Pump, Biorad, Richmond, USA
- BioRad Model 583 gel dryer, BioRad Laboratories, CA, USA

Magnetrührer

- IKACombimag RCO, IKA GmbH & Co, Staufen, Deutschland

Netzgerät

- Power Pac 300, Biorad, Richmond, USA
- Standard Power Pack P25, Biometra, biomedizienische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland

PCR-Maschinen

- Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer, Conneticut, USA
- Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer, Conneticut, USA
- T-Gradient Thermoblock, Biometra, Deutschland

pH-Meter

- Metrohm 620 mit Glaselektrode, Metrohm, Herisau, Schweiz

Photometer

- Dr. Lange Digitalphotometer LP2W
- Perkin Elmer Lambda 15 UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
- LKB-Ultrospec Plus Spectrophotometer, Amersham Pharmacia, England
- Novaspec II Visible Spectrophotometer, Amersham Pharmacia, England

Sequenzierapparatur

- LI-COR® Inc., Lincoln, USA

Sequenziergerät

- DNA-Sequencer LI-COR® Model 4000 L, MWG
dazugehörige Software Base ImagIR™ 2.3 LI-COR®, Lincoln, USA
- DNA-Sequencer LI-COR® Model 4200 Long Radir, MWG
dazugehörige Software e-Seq V3.0 LI-COR®, Lincoln, USA

Thermomixer

- Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Ultrafiltration

- MikrosepTM-Mikrokonzentrator, PALL Gelman Laboratory, PALL GmbH, Dreieich Sprenningen, Deutschland

Ultraschall

- Branson Sonifier 450, Branson Instruments Inc., Dranbury, CT, USA

Waagen

- Mettler Toledo AG 204, Mettler Toledo AG, Greifensee, Schweiz
- Sartorius 1264MP, 2444, Sartorius Werke GmbH, Göttingen, Deutschland

Wasseraufbereitungsanlage

- Millipore Q Gard[®] 2, Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland

Zentrifugen

- Avanti J-25 Beckman Coulter, USA mit Rotoren JA20, JA14 und JA10
- Tischzentrifuge centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Kühlzentrifuge Z 233 MK, Hermle, Wehingen, Deutschland
- Speed Vac Concentrator/Refrigated Condensation Trap, Bachofer, Reutlingen, Deutschland
- Ultrazentrifuge TL-100, Beckman Coulter, USA mit den Rotoren TLA120.2 und TLA100.3
- Ultrazentrifuge OptimaTM LE-80K, Beckman Coulter, USA mit dem Rotor Ti60

2.2 Materialien

2.2.1 Säulen- und Batchmaterial

Qiagen AG, Hilden, Deutschland

- Ni-NTA-Agarose

2.2.2 Materialien zur Filmentwicklung

Agfa Gevaert AG, Leverkusen, Deutschland

- Film (Agfa Cronex 5)
- Entwickler (Agfa Rodinal)
- Fixierer (Agfa Agefix)

2.2.3 Membranen

Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

- Nitrocellulose Blottingmembran
- Whatmanfilter GB 004

Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA

- PVDF-Membrane Amersham HybondTM-P

2.2.4 Chemikalien und Enzyme

2.2.4.1 Chemikalien

Anatrace Inc., Maumee, OH, USA

- N-Dodecyl- β -D-maltosid (DOM)

Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

- Bio-Rad Protein Assay
- Bromphenolblau

Biozym, Hess, Oldendorf, Deutschland

- Long Ranger

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland

- EDTA (Na₂-Salz)

Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland

- Monomerlösung

E. Merck, Darmstadt, Deutschland

- Ethanol
- Ethidiumbromid
- Essigsäure, 96%
- HCl rauchend, 37%
- Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)
- Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)
- Natriumhydroxidplättchen, reinst
- Natriumsulfat (Na_2SO_4)
- TCA
- Tween-20

Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

- Formaldehyd, 36,5%
- Glucose
- Glycerol
- Imidazol
- Kaliumhydrogensulfat (KH_2PO_4)

GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg, Deutschland

- Agar
- DTT
- IPTG

Heirler Cenovics GmbH, Radolfzell, Deutschland

- Magermilchpulver

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

- Aceton
- Ammoniumpersulfat
- BSA
- Hepes
- Isopropanol
- Kaliumchlorid
- Kanamycin

- PMSF
- Ponceau S
- SDS
- TEMED
- Tricin

Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

- Coomassie Brilliant blue R

Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England

- Hefeextrakt
- Trypton

USB United States Biochemical Corp., Cleveland, OH, USA

- Agarose ultrapure
- Ampicillin
- Digitonin
- Glycin
- NaCl
- N-Lauroylsarcosin (Sarcosyl)
- Sucrose
- Tris
- Triton X-100

2.2.4.2 Enzyme

DNase I

- Boehringer GmbH, Mannheim, Deutschland

Lysozym

- Serva GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland

Pfu-Ultra-DNA-Polymerase

- Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Ca, USA

Proteinase K

- Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA,

Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase

- MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

Thermo Sequenase

- Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA

2.2.4.3 KitsECL-Reaktionskit

Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA

E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I

peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit

Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA

High Pure PCR Product Purification Kit

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Sequenase Kit

Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA

2.2.5 AntikörperAnti-His Antibody

- mouse monoclonal Antibody IgG_{2a}, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA

Anti-KdpD Antibody

- polyklonaler Antikörper gegen KdpD, erhalten von K. Jung und K. Altendorf, Universität Osnabrück, Deutschland

Anti-Mouse Ig, horseradish-peroxidase

- Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA

Anti-Rabbit Ig, horseradish-peroxidase

- Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA

2.2.6 Kulturmedien

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

Trypton	1%
Hefeextract	0,5%
NaCl	1%

KML-Medium (Epstein und Kim, 1971)

Trypton	1%
Hefeextract	0,5%
KCl	1%

Für die Herstellung der Agarplatten wurde den Flüssigmedien 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

TY-Medium

Trypton	1%
Hefeextract	0,5%

PSI-Broth

LB-Medium

MgSO ₄	4 mM
KCl	10 mM

Minimalmedium (Epstein und Davies, 1970)

Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	46 mM
NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O	23 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 mM
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,4 mM
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	6 μM
KCl	(je nach gewünschter Endkonzentration)

Das Medium wurde autoklaviert und kurz vor Gebrauch die restlichen Bestandteile dazugegeben.

Glucose	0,4% (w/v)
Thiamin-hydrochlorid	1 mg/l

Für den K0,1-Agar wurden 15 g/l Agar mit 30 g/l NaCl und danach dreimal mit Millipore-Wasser gewaschen um Kalium zu entfernen. Dieser gewaschene Agar wurde zum K0,1-Minimalmedium gegeben und dann autoklaviert. Nach dem Abkühlen, wurden dem lauwarmen K0,1-Agar die erforderlichen Antibiotika, Glucose und Thiamin-hydrochlorid zugesetzt.

2.2.7 Puffer

AB-Mix

Acrylamid	49,5%
Bisacrylamid	3%

mit H₂O auffüllen

Anodenpuffer

Bistris	50 mM
---------	-------

pH 7,0 mit HCl einstellen

DNA-Probenpuffer (10 ×)

Tris/HCl (pH 7,5)	10 mM
EDTA	50 mM
Ficoll 400	10%
BPB	0,25%

Gel Puffer (3 ×)

EACA	200 mM
Bistris	150 mM

pH 7,0 mit HCl einstellen

Kathodenpuffer A

Tricin	50 mM
Bistris	15 mM
Serva Blue G	0,02%

pH 7,0 stellt sich ein, im Kühlschrank aufbewahren

Kathodenpuffer B

Tricin	50 mM
--------	-------

Bistris 15 mM

pH 7,0 stellt sich ein, im Kühlschrank aufbewahren

Lysepuffer

Tris 20 mM

EDTA 0,1 mM

EACA 0,75 M

Glycerin 10%

pH 7,0 mit HCl einstellen

zur Anwendung mit Detergenz komplettieren und 1 mM PMSF

PBS (10 ×)

NaCl 1,5 M

KCl 30 mM

KH₂PO₄ 15 mM

Na₂HPO₄ × 2 H₂O 80 mM

pH 7,4 stellt sich von allein ein

Probenpuffer (Blue Native Gel)

EACA 500 mM

Bistris 100 mM

Serva Blue G 5%

pH 7,0 mit HCl einstellen

Sammelgelpuffer

Tris 1,5 M

pH 8,8 mit HCl einstellen

SDS-Probenpuffer (5×)

Tris-HCl, pH 6,8 300 mM

SDS 5%

Glycerin 50%

BPB 0,05%

DTT 100 mM (frisch dazugeben)

Sphäroplasten-Puffer

Saccharose 40%

Tris (pH 8,0) 33 mM

Tank-Puffer (10 ×)

Tris 25 mM
Glycin 192 mM
SDS 0,1%

auf pH 8,3 einstellen (für den Gebrauch auf 1× Laufpuffer mit H₂O verdünnen)

TBE-Puffer (10 ×)

Tris 0,89 M
Borsäure 0,89 M
EDTA 0,02 M

TBS-Puffer (10 ×)

Tris 200 mM
NaCl 1,5 M

pH 7,5 mit HCl einstellen

TE-Puffer

Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM
EDTA 0,1 mM

TFB1-Puffer

RbCl 100 mM
MnCl₂ 50 mM
KAc 30 mM
CaCl₂ 10 mM
Glycerol 15%

pH 5,8 mit Essigsäure einstellen

TFB2-Puffer

MOPS 10 mM
RbCl 10 mM
CaCl₂ 75 mM
Glycerol 15%

pH 8,0 mit KOH einstellen

Transferpuffer

Tris	25 mM
Glycin	192 mM

Trenngelpuffer

Tris	1,5 M
------	-------

pH 8,8 mit HCl einstellen

Z-Puffer

Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O	60 mM
NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	40 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	1 mM
β-Mercaptoethanol	50 mM

pH 7,0 mit HCl einstellen

2.2.8 Bakterienstämme

2.2.8.1 *E. coli* XL-1 blue (Bullock *et al.*, 1987)

- Genotyp: supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻[proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tet^r)]
- Derivat des *E. coli* Stammes K12
- zur Isolierung und Transformation von Plasmid-DNA verwendet

2.2.8.2 *E. coli* C41(DE3) (Miroux und Walker, 1996)

- Spontanmutante des *E. coli* Stammes BL21(DE3)
- zur Überexpression rekombinanter Proteine eingesetzt

2.2.8.3 *E. coli* M15 (pREP4)

- Derivat des *E. coli* K12 Stammes mit dem Phänotyp: Nal^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺.
- enthält das Plasmid pREP4, mit einer Kanamycinresistenz und dem *lacI* Gen
- zur Expression rekombinanter Proteine
- Qiagen AG, Hilden, Deutschland

2.2.8.4 *E. coli* MC1061 (Casadaban *et al.*, 1980)

- Genotyp: Δ acX74 Δ ara-leu galK strA hsdR
- zur Expression der Proteine für die Natrium-Carbonat Methode

2.2.8.5 *E. coli* HAK006 (Nakashima *et al.*, 1993)

- Genotyp: Δ kdpABCD Δ (lac-pro) ara thi
- Deletion von *kdpA*, *kdpB*, *kdpC*, *kdpD*
- *kdpE* ist vollständig vorhanden
- mit *lac-Z* Gen
- wurde für den β -Galactosidase-Nachweis verwendet

2.2.8.6 *E. coli* TKV2208 (Völkner, 1991)

- Genotyp: Δ kdpD *trkA405 trkD1 nagA thi rha lacZ*
- mit einer teilweisen Deletion von *kdpD* (Aminosäuren 1 bis 127 sind erhalten)
- wurde für den Wachstumstest im Minimalmedium verwendet

2.2.8.7 *E. coli* HJM114 (Wickner und Killick, 1977)

- Genotyp: *F' lacpro/∇ lacpro XIII ϕ 80d_{II} lac str^Rmal mtf x-yI BI*
- wurde als Kontrollstamm bei der Reinigung aus dem Minimalmedium zum Vergleich der coeluierten Banden verwendet

2.2.9 Plasmide**2.2.9.1 pT7-7 (Tabor und Richardson, 1985)**

pT7-7 ist ein *E. coli*-Klonierungsvektor, der einen T7-RNA-Polymerase Promotor \varnothing 10 enthält (s. Abb. 11). Das Plasmid besitzt ein β -Lactamase-Gen, das eine Resistenz gegen Ampicillin verleiht.

Die Konstrukte von *kdpD* wurden zuerst in diesen Vektor transformiert, da die RBS (Ribosome binding site) von pT7-7 übernommen wurde.

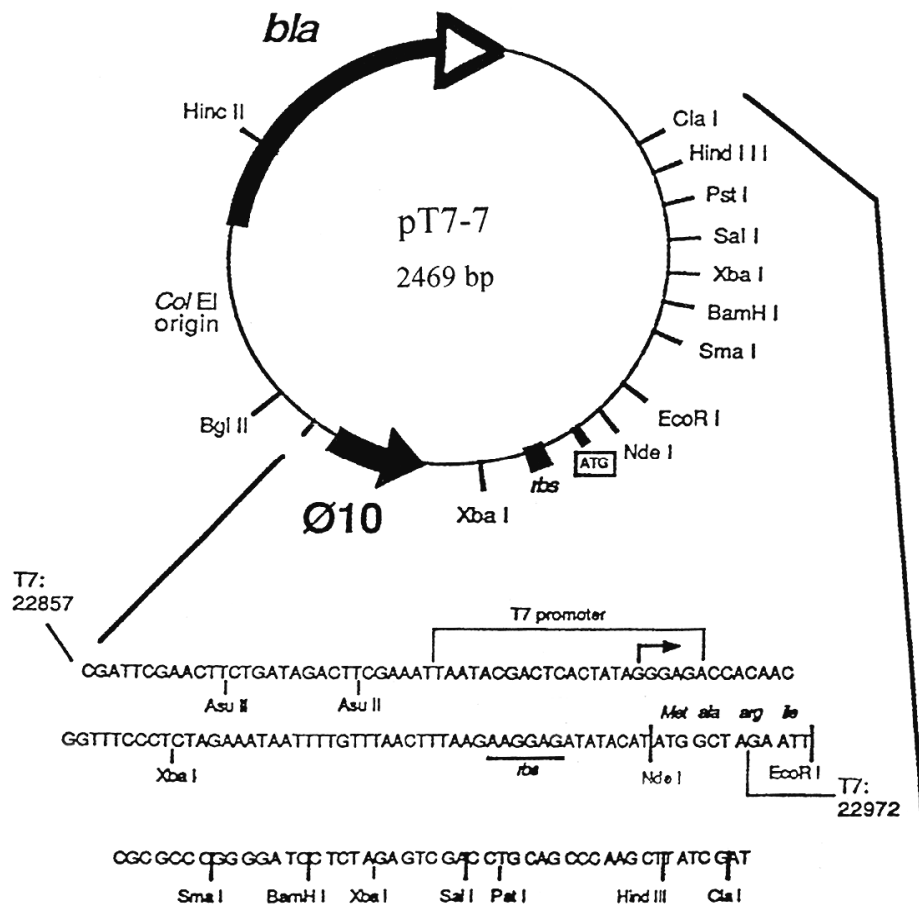


Abb. 11 Restriktionskarte und Polylinker des pT7-7 Plasmids.

2.2.9.2 Die pBAD Vektoren pBAD18 und pBAD33 (Guzman *et al.*, 1995)

Die pBAD Vektoren pBAD18 und pBAD33 werden als Expressionssysteme genutzt. Sie enthalten den P_{BAD} -Promotor von dem *araBAD* (Arabinose) Operon und das Gen *araC*, das die positive und negative Regulation dieses Promotors reguliert. Die Expression kann durch verschiedene Konzentrationen von Arabinose induziert und durch den Repressor Glucose auf ein sehr niederes Level reduziert werden.

pBAD18

Dieses 4,6 kb große Plasmid (s. Abb. 12) besitzt eine Ampicillin-Resistenz und das Origin pBR322. Es wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III geschnitten und die C-terminalen Fragmente von KdpD hineincloniert.

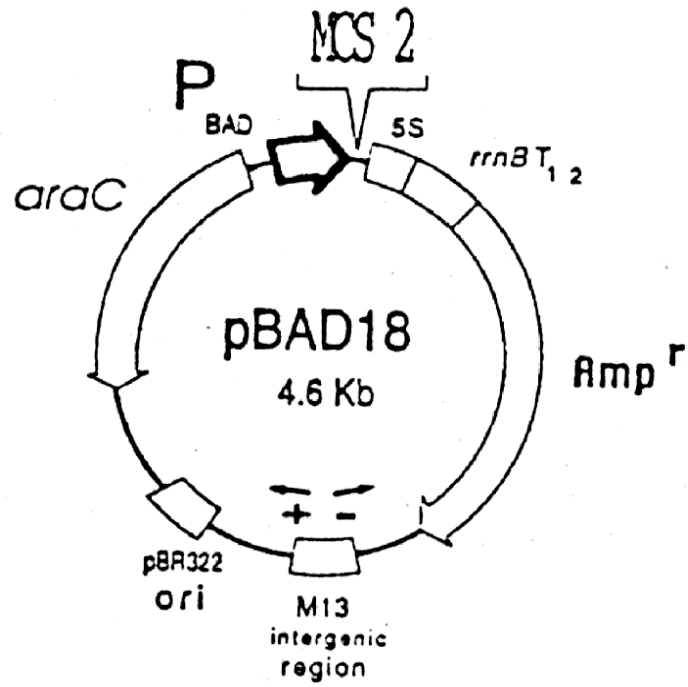


Abb. 12 Die Restriktionskarte von pBAD18.

pBAD33

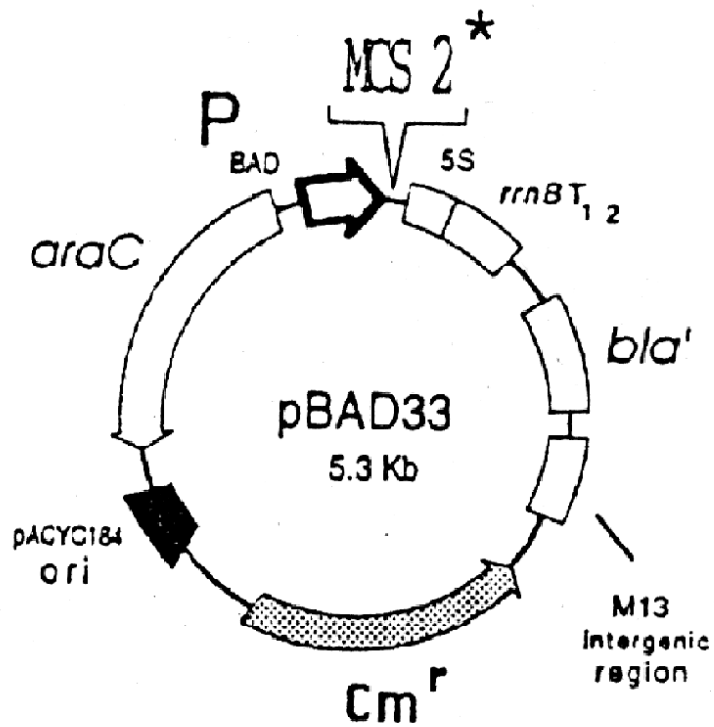


Abb. 13 Restriktionskarte von pBAD33.

Dieses 5,3 kb große Plasmid (s. Abb. 13) ist ein Derivat des pBAD18 Plasmids. Es enthält das pBR322-kompatible pACYC184 Origin und besitzt eine Chloramphenicol Resistenz.

Das Plasmid wurde mit den Restriktionsendonucleasen *Xba*I und *Pst*I geschnitten und die N-terminalen Fragmente von KdpD hineincloniert (Rothenbücher, 2000).

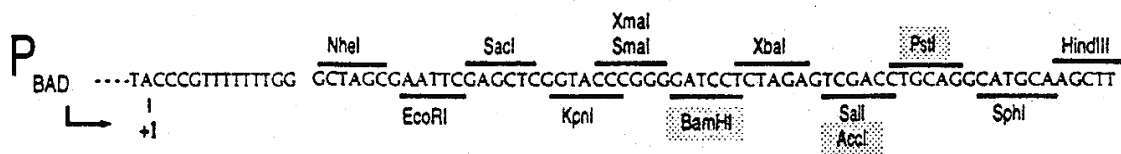


Abb. 14 MCS von pBAD18 und pBAD33.

Alle Stellen auf der MCS (multiple cloning site), bis auf die schattierten, sind einfache Schnittstellen. Die schattierten, *Bam*HI, *Accl* und *Pst*I, sind doppelte Schnittstellen (s. Abb. 14).

2.2.9.3 pQE30 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA)

Der *E. coli* pQE30 Vektor (s. Abb. 15) basiert auf dem T5-Promotor Transkriptionssystem. Der Promotor entstammt dem T5-Phagen und bildet zusammen mit zwei *lac* Operatorsequenzen ein optimiertes Promotor-Operator-Element. Zusätzlich gibt es eine für 6 Histidine kodierende Sequenz, die ein Fusionsprodukt mit einem N-terminalen His-Tag liefert.

Das β -Lactamasegen *bla* verleiht die Ampicillinresistenz, die der Selektion dient.

Die extrem hohe Transkriptionsrate, die am T5-Promotor initiiert wird, kann nur effizient reguliert und reprimiert werden, wenn eine große Menge des Lac Repressorproteins vorhanden ist. Aus diesem Grund enthält der *E. coli* Expressionsstamm M15 das Plasmid pREP4 (s. 2.2.8.3). Dieses verleiht Kanamycinresistenz und exprimiert das vom *lacI* Gen kodierte Lac Repressorprotein (Farabaugh, 1978).

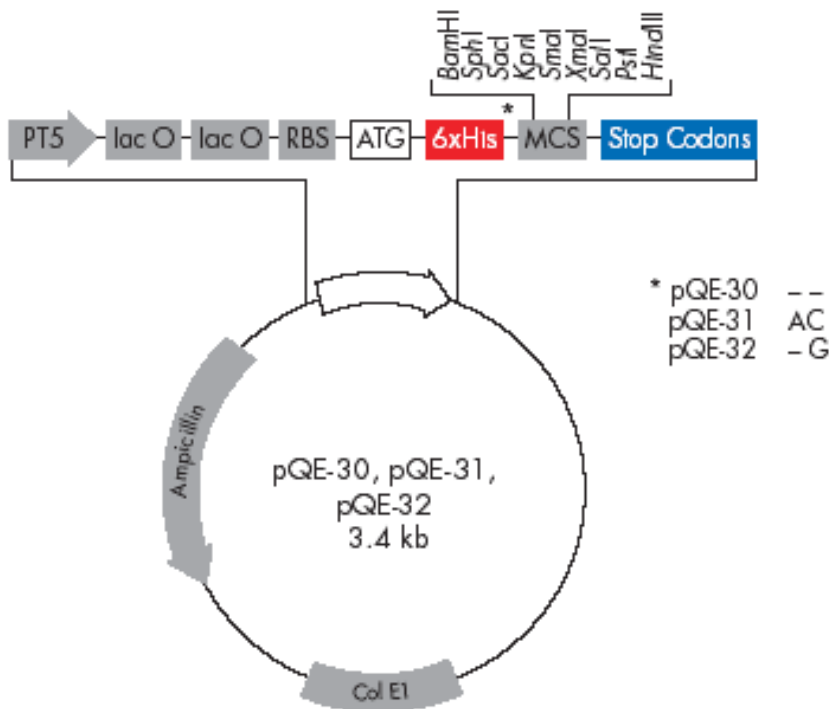


Abb. 15 Restriktionskarte und MCS des pQE30 Vektors.

2.2.9.4 pET16b (Novagen Inc., Madison, WI, USA)

pET16b (s. Abb. 16 und 17) enthält einen T7-RNA-Polymerase-Promotor sowie eine $\Phi 10$ Shine-Dalgarno-Sequenz in geeignetem Abstand zur MCS. Die Gene, die in die MCS kloniert werden, können anschließend in speziellen *E. coli* Stämmen mit T7-RNA-Polymerase gezielt überexprimiert werden (Studier *et al.*, 1990). Zusätzlich enthält der Klonierungsvektor eine His-Tag-Sequenz, die nach Klonierung eines Gens in die MCS, ein Fusionsprodukt mit einem N-terminalen $10 \times$ His-Tag liefert. Des Weiteren trägt der Vektor ein Resistenzgen gegen Ampicillin, welches der Selektion dient.



Abb. 16 Multicloningsite des Vektors pET16b.

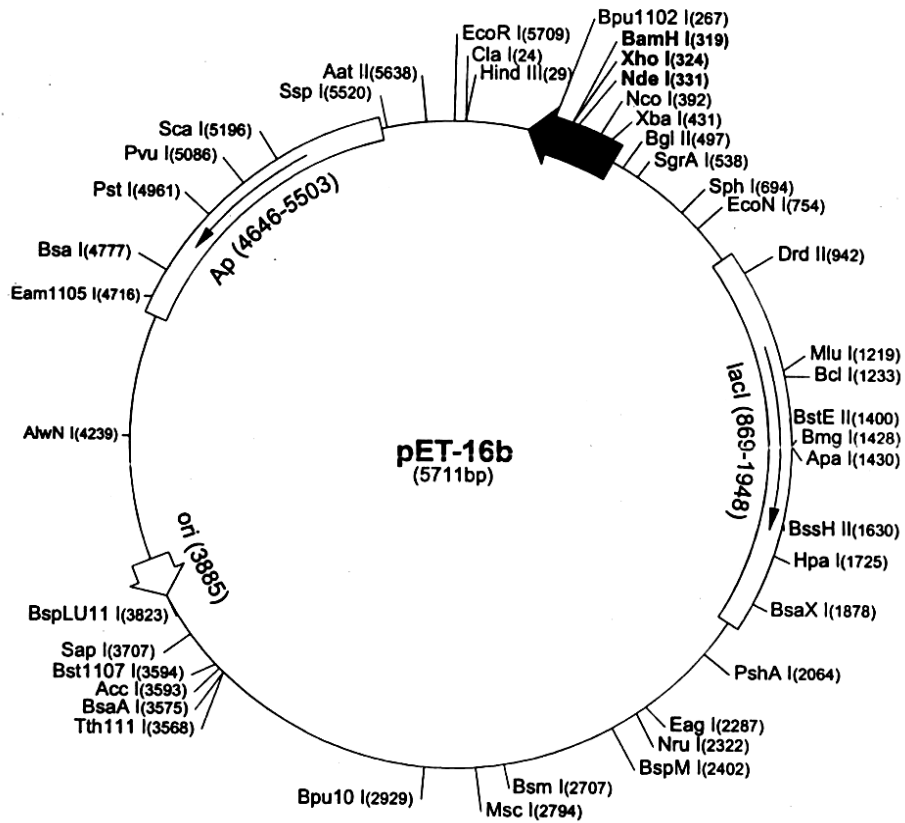


Abb. 17 Restriktionskarte von pET16b.

2.2.10 Antibiotika

Es wurden folgende Stammlösungen hergestellt, die aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt wurden. Wässrige Lösungen wurden zuvor steril filtriert.

Antibiotika	Stammlösung	Arbeitskonz	Bezugsquelle
Ampicillin	100 mg/ml H ₂ O	100-200 µg/ml	Fluka
Chloramphenikol	100 mg/ml Ethanol 10 mg/ml Ethanol	25 µg/ml 25 µg/ml	Fluka
Kanamycin	25 mg/ml H ₂ O	25 µg/ml	Sigma

Tab. 1 Stammlösungen und Konzentrationen der verwendeten Antibiotika.

2.3. Methoden

2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Miniprep)

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurde das Kit von PeqLab (s. 2.2.4.3), nach folgendem, modifizierten Protokoll verwendet. Die Minipräparation geht nach dem Prinzip der alkalischen Lyse vor.

Von einer Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli* Stammes wurden 1,5 ml bis 2 ml Bakteriensuspension entnommen und für 1 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Die Zellen wurden dann, wie angegeben, mit 250 µl Lösung1 resuspendiert. Dann wurde mit 250 µl der Lösung2 lysiert und mit 350 µl der Lösung3 die chromosomale DNA gefällt. Die Zelltrümmer und die chromosomale DNA wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert. Der klare Überstand wurde in einen Filter gegeben und 30 s zentrifugiert. Der Filter wurde mit 500 µl HBN-Puffer gewaschen und danach zweimal mit 500 µl des Waschpuffers gewaschen. Durch eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm wurde der Filter von den Rückständen des Waschpuffers befreit. Der trockene Filter wurde in ein frisches, steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 30 bis 100 µl TE-Puffer (s. 2.2.7) eluiert.

2.3.1.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Um die Quantität der DNA-Konzentration zu ermitteln wurde ein Spectrophotometer verwendet. Hierbei gilt für doppelsträngige DNA, dass eine Extinktion von 1, gemessen bei einer Wellenlänge von 260 nm, einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Daher kann folgende Formel zur Bestimmung der DNA-Konzentration angewandt werden.

$$c \text{ [}\mu\text{g/ml]} = E_{260} \times 50 \text{ }\mu\text{g/ml} \times F$$

c = DNA-Konzentration

E = Extinktion bei $\lambda = 260$ nm

F = Verdünnungsfaktor

2.3.2 Restriktionsendonukleasen und Restriktionsspaltung

2.3.2.1 Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen gehören der Klasse II an. Diese Erkennungssequenz besteht aus vier oder sechs Nukleotiden, die meist invers repetitiv angeordnet, als sogenannte Palindrome vorliegen. Alle hier verwendeten Enzyme so wie die zugehörigen Puffer wurden von der MBI-Fermentas GmbH, Deutschland bezogen.

2.3.2.2 Restriktionsspaltung

Für die Reaktionsansätze wurden die durch die Minipräparation (s. 2.3.1) erhaltenen DNA-Plasmide eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 10 µl bis 30 µl. Der jeweilige spezifische Reaktionspuffer (10% des Gesamtvolumens), vom gleichen Hersteller wie das Enzym (MBI-Fermentas GmbH, Deutschland), liefert dem entsprechenden Enzym das benötigte Ionenmilieu und die Cofaktoren.

Die Reaktionsansätze wurden mindestens 2 h, besser über Nacht, bei 37°C inkubiert.

Bei einem Mehrfachverdau der DNA, d.h. mit verschiedenen Enzymen, wurde der Reaktionspuffer ausgetauscht, wenn die Enzyme verschiedenen Ionenmilieus benötigten.

Eine schnelle Möglichkeit bietet die Reinigung über eine Sephadex-Säule. Dazu wurde ein steriles 0,5 ml Eppendorfgefäß, mit einem kleinen Loch im Boden, in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und mit ca. 700 µl G10-Sephadexmaterial in TE-Puffer (s. 2.2.7) gefüllt. Das Säulenmaterial wurde 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert und mit 200 µl TE-Puffer zweimal gewaschen. Dann wurde die Säule in ein neues, steriles Eppendorfgefäß gegeben und die Probe aufgetragen. Die DNA wurde mit 14000 rpm für 2 min abzentrifugiert, danach konnte der zweite Verdau angesetzt werden.

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Trennung und Identifizierung von DNA-Molekülen anhand ihres Molekulargewichtes. Innerhalb eines bestimmten Bereichs ist die Wandergeschwindigkeit der DNA-Moleküle proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Lässt man einen

Längenstandard mit bekannten Größen mitlaufen, kann man aus der Wanderstrecke der DNA auf das Molekulargewicht schließen. Um die Größe zu bestimmen wurden folgende Längenstandards aufgetragen, Lambda-DNA geschnitten mit *Pst*I oder *Hind*III (s. 2.3.2). Nach der Gelelektrophorese können die aufgetrennten Nucleinsäuren und deren Fragmente durch den interkaliierenden Acridinfarbstoff Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.3.3.1 Herstellung von Agarosegelen

Für die Elektrophorese wurden horizontale Gele mit 0,7% bis 1,5% Agarose in 1×TBE-Puffer (s. 2.2.7) verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose durch Kochen in TBE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf 60°C und Zugabe des Ethidiumbromids (0,5 mg/ml) gegossen. Nachdem das Gel festgeworden war, wurde es mit 1×TBE-Puffer überschichtet und der Taschenkamm entfernt. Zu den Proben wurden mit 0,1 Volumina DNA-Probenpuffer gegeben und damit die Taschen des Agarosegels beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei RT und einer konstanten Spannung von 1,8 bis 5 V/cm. Nach dem Lauf wurde das Gel unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und fotografiert.

2.3.3.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Gewinnung eines bestimmten DNA-Fragments aus einem Agarosegel wurde das GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit von Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA (s. 2.2.4.3) angewandt.

Die gewünschte Gelbande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein abgewogenes, steriles Eppendorfgefäß gegeben. Dies wurde dann nochmal mit dem Gel gewogen, um das Gewicht des Gels zu bestimmen. Dann wurden 10 µl Capture-Puffer pro 10 mg Gel hinzugefügt und auf einem Whirlmix gemischt. Zur Dissoziation des Agarosegels wurde der Ansatz 5 bis 15 min bei 60 °C inkubiert. Als das Gel vollständig verflüssigt war, wurde 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine GFX-Säule mit Auffanggefäß gegeben. Nach nochmaligem zentrifugieren für 30 s bei 14000 rpm, wurde zweimal mit 500 µl Washing-Puffer gewaschen und danach wieder zentrifugiert (30 s, bei 14000 rpm). Die nun trockene Säule wurde in ein neues, steriles Eppendorfgefäß gesetzt. Es wurde mit 30 µl bis 50 µl TE-Puffer (s. 2.2.7) eluiert und dann 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die GFX-Säule wurde entfernt und die gereinigten DNA-Fragmente bei

-20 °C aufbewahrt oder weiterverarbeitet.

2.3.4 Ligation

Bei der Ligation erfolgt eine Verknüpfung der DNA-Fragmente mit Hilfe der aus T4-Phagen stammenden T4-DNA-Ligase (s. 2.2.4.2). Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxygruppe und dem 5'-Phosphatende doppelsträngiger DNA-Moleküle. Für die Ligation von klebrigen Enden (Sticky End Ligation) wurden für Vektor-DNA und Insert-DNA ein Verhältnis von 1: 3 bis 1: 5 gewählt.

Vektor-DNA und Insert-DNA wurden in einem sterilen Eppendorfgefäß für 10 min auf 65°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Dies trennt die klebrigen Enden, bei denen während der Präparation intermolekulare Wasserstoff-Bindungen entstanden sind. Dann wurde der 10 × Ligationspuffer (MBI) und die 1U T4-DNA-Ligase zugegeben. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 10°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 min bei 65°C gestoppt. Von dem Ligationsansatz wurden 10 µl für die anschließende Transformation kompetenter *E. coli* Zellen verwendet und der Rest bei ca. 10°C aufgehoben.

2.3.5 Transformation

2.3.5.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die kompetenten Zellen wurden die *E. coli* Stämme XL1-Blue, HAK 006 und TKV 2208 (s. 2.2.8) verwendet. Um die DNA-Aufnahmefähigkeit der für die Transformation eingesetzten Bakterienzellen zu erhöhen, muss die Zellwand der Bakterien durchlässig gemacht werden.

Aus einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstamms wurde 1 ml in 100 ml vorgewärmtes Medium gegeben und bei 37°C geschüttelt bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5. Für *E.coli* XL1-Blue und *E.coli* HAK 006 wurde LB-Medium (s. 2.2.6) verwendet, für *E.coli* TKV 2208 KML-Medium (s. 2.2.6). Die folgenden Schritte wurden bei 0°C durchgeführt. Die Zellen wurden in sterilen JA14-Bechern für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig mit 30 ml eiskaltem TFB1-Puffer (s. 2.2.7) resuspendiert und danach 90 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation in sterilen JA20-Bechern für 5 min bei 4000 rpm wurden die Zellen in 4

ml eiskaltem TFB2-Puffer (s. 2.2.7) aufgenommen und nochmals für mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Diese nun kompetenten Zellen wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aliquots wurden bei -70°C aufbewahrt.

2.3.5.2 Transformation kompetenter Zellen

Für die Transformation wurden die tiefgefrorenen, kompetenten Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut. In ein steriles Eppendorfgefäß wurden dann 50 μl kompetente Zellen und 10 μl Ligationsansatz oder 1 μl isolierte Plasmid-DNA (0,1 μg bis 1 μg DNA) gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C an den sich eine zweiminütige Inkubation auf Eis anschloss. Danach wurden 100 μl LB-Medium (*E. coli* XL1-Blue, *E. coli* HAK 006) oder PSI-Broth (*E. coli* TKV 2208) zugegeben (s. 2.2.6). Die Bakterien wurden für 90 min bei 37°C vorsichtig geschüttelt und anschließend in verschiedenen Verdünnungen auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Kolonien auf der Selektionsplatte wurden gepickt und die Plasmid-DNA isoliert (s. 2.3.1). Die isolierte DNA wurde durch einen Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert (s. 2.3.2) und zur Auswertung auf ein Agarosegel (s. 2.3.3) aufgetragen.

2.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der *in vitro* Amplifizierung einer Template-DNA. Zuerst wird die DNA denaturiert, anschließend wird die Temperatur gesenkt, damit die Primern an die DNA hybridisieren (Annealing). In der Elongationsphase lagert sich die thermostabile DNA-Polymerase an das 3'-Ende des Primer an und verlängert dieses in 5'→3' Richtung. Hierbei entspricht die Temperatur dem Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase (s. 2.2.4.2).

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95°C	1 min	1
Denaturierung	95°C	20 s	30
Annealing	Spez.	30 s	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	7 min	1
Abkühlung	4°C	∞	1

Tab. 2 Programm für die PCR-Reaktion

Für die PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz in ein steriles Eppendorfgefäß pipetiert:

- 5 µl 10x Pfu-Ultra-DNA-Polymerase Puffer (Stratagene Cloning Systems)
- 1 µl (100 ng) Primer a
- 1 µl (100 ng) Primer b
- 1 µl dNTP-Mix (50 µM Endkonzentration je Nukleotid)
- x µl (0,1-0,75 µg) Plasmid-Template
- x µl H₂O bidest. (Endvolumen von 50 µl)
- 1 µl Pfu-Ultra-DNA-Polymerase (2,5 U/µl von Stratagene Cloning Systems)

2.3.6.1 Reinigung des PCR-Produkts

Zur Aufreinigung des PCR-Produktes wurde das High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) verwendet (s. 2.2.4.3) und nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Der PCR-Ansatz wurde mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt, mit 500 µl Bindepuffer gemischt und auf ein Filtrationsgefäß pipettiert. Durch Zentrifugation wurden die Nukleinsäuren an die Silikamatrix gebunden und die Verunreinigungen mit dem Durchlauf ausgewaschen. Es folgten zwei Waschschriffe, gefolgt von einer Zentrifugation. Die trockene Säule wurde nun in ein steriles Eppendorfgefäß überführt, mit 45 µl bis 100 µl Elutionspuffer versetzt und das PCR-Produkt durch Zentrifugieren eluiert.

Um den Erfolg der Polymerasenkettenreaktion zu überprüfen, wurde eine Probe auf ein Agarosegel (s. 2.3.3) aufgetragen.

2.3.7 QuikChange-Reaktion

Die QuikChange-Reaktion (site-directed mutagenesis) ist eine ortsspezifische Mutagenese, bei welcher das gewünschte Fragment *in vitro* mutiert und synthetisiert wird.

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	18
Annealing	50°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Nachbehandlung	72°C	7 min	1
Endtemperatur	30°C	∞	1

Tab. 3 Programm für die QuikChange-Reaktion

Diese Methode wird ebenfalls mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase (s. 2.2.4.2) unter denselben Reaktionsbedingungen wie eine PCR durchgeführt. Die Primer sind jedoch komplementär, so dass bei jedem Zyklus ein komplettes Plasmid mit der speziellen Mutation erzeugt wird.

Für die PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz in ein Eppendorfgefäß pipetiert:

5 µl 10x Pfu-Ultra-DNA-Polymerase Puffer
1 µl (100 ng) Primer 1
1 µl (100 ng) Primer 2
1 µl dNTP-Mix (Endkonzentration: 50 µM)
x µl Plasmid-DNA (0,6 - 0,8 µg)
x µl H₂O bidest. (Endvolumen von 50 µl)
1 µl Pfu-Ultra-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

Nach Ablauf der Reaktion wird pro Ansatz 1 µl *DpnI* (5 U/µl) zugegeben und für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. *DpnI* verdaut die methylierte Template-DNA.

2.3.8 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA wurde die Kettenabbruch- oder Didesoxymethode nach Sanger *et al.*, 1977 angewandt. Die Methode erfordert einzelsträngige DNA als Matrize sowie ein kurzes DNA-Molekül, den fluoreszenzmarkierten Primer. Dieser ist komplementär zu einem DNA-Abschnitt im Sequenzierungsvektor und bindet in Nachbarschaft der zu analysierenden Sequenz an die Template-DNA. Ausgehend von dem 3'-Ende des Primers synthetisiert eine DNA-Polymerase in Gegenwart aller 4 dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphat) komplementäre Kopien der DNA.

Es werden vier Reaktionen angesetzt, von denen jede neben den oben beschriebenen Komponenten zusätzlich eines der vier ddNTP (Didesoxyribonukleosidtriphosphat) enthält. Diesen Verbindungen fehlt nicht nur die 2'-, sondern auch die 3'-Hydroxygruppe, so dass ihr Einbau zu einem Kettenabbruch führt.

Nach Abschluss der Reaktion befindet sich in jedem Reaktionsansatz eine Population von DNA-Molekülen, die alle ein gemeinsames 5'-Ende haben, sich aber in der Länge bis zum jeweils basenspezifischen 3'-Ende hin unterscheiden. Die vier

Gemische werden nebeneinander auf ein denaturierendes Harnstoffgel aufgetragen. Die DNA-Fragmente werden nach ihrer Größe aufgetrennt und am Computer mit der Software Base ImagIR™ 2.3 LI-COR® Inc., Lincoln, USA, ausgewertet.

2.3.8.1 Primer

Je nachdem, in welchen Vektor (s. 2.2.9) das KdpD-Konstrukt kloniert wurde, wurde für die Sequenzierungen folgende fluoreszenzmarkierten Primer ausgewählt.

Name	Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur (°C)
KdpD-1	CACATCCGCAAGGAATGACGC	56
KdpD-2	CGCCCGCCAGGCCAGCGAGA	64
KdpD-3	GAATAAAGAGTCGGCAGTAC	50
KdpD-4	CCGGCGCTGATCTTAATGGAC	55
KdpD-7	TCGCGCTTGATGAACCACCCG	56
KdpD-9	CTGGCACTGCGCCGTA CTGC	60
KdpD-RV	CCCGATGGTTTTCTCGCCGC	56
pBAD-FW	CTGTTTCTCCATACCCGTT	50
pBAD-RV	GGCTGAAAATCTTCTCT	46
pT7-FW	TAATACGACTCACTATAGGG	54
pT7-RV	CGCTGAGATAGGTGCAC	58
pQE30-FW	CGGATAACAATTTACACACAG	48
pQE30-RV	GGTCATTACTGGAGTCTTG	48

Tab. 4 Primer für die Sequenzierung des *kdpD* Gens (2,7 kb) und die Forward (FW) und Reverse (RV) Primer für die jeweiligen Klonierungsvektoren pBAD18, pBAD33, pT7-7 und pQE30.

Die verwendeten Primer (fluoreszenzmarkiert, IRD 800) wurden ursprünglich von der Firma MWG-Biotech bezogen. Für die Sequenzierung wurden die Primer auf eine Konzentration von 2 pmol/μl verdünnt.

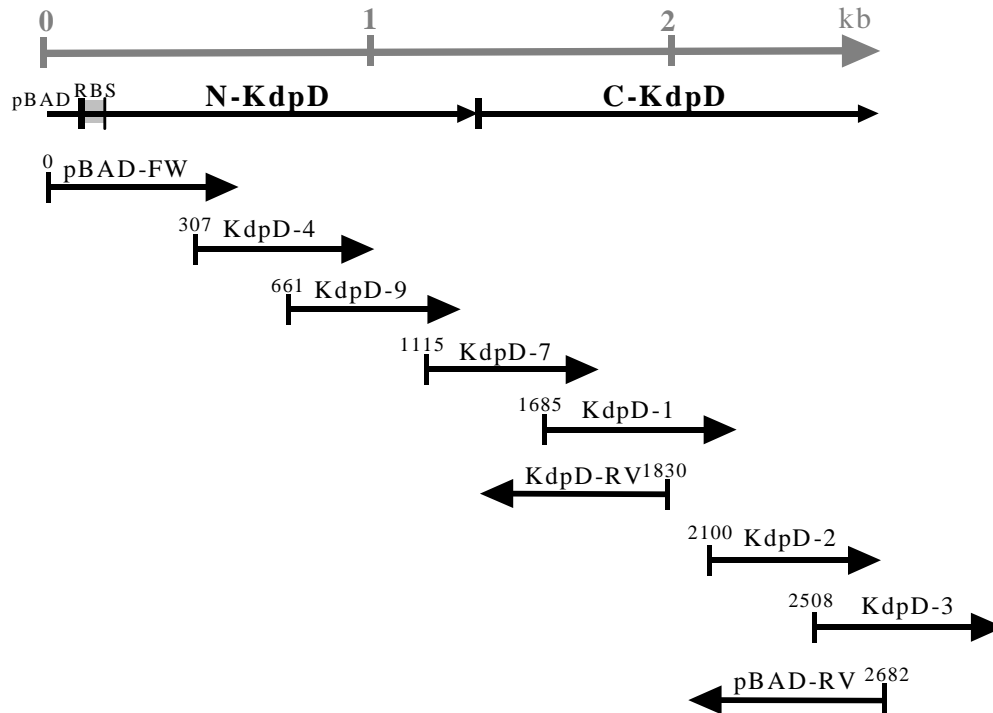


Abb. 18 Schematische Darstellung des Wirkungsortes der Sequenzierungsprimers anhand der KdpD-Sequenz. Hier die pBAD-FW und -RV Primer für die KdpD-Konstrukte, die in die pBAD-Vektoren kloniert wurden.

2.3.8.2 Herstellung von Sequenziergelen

Die Gelapparatur von LI-COR[®] Inc. wurde nach Herstelleranweisung aufgebaut und das Harnstoffgel gegossen.

Sequenziergel (Harnstoffgel)

Harnstoff (ultrapure)	21 g
Long Ranger [™]	6 ml
10 × TBE-Puffer	6 ml
ddH ₂ O	10 ml

Die Lösung wurde bei 37°C geschüttelt, bis sich der Harnstoff gelöst hatte und anschließend mit ddH₂O auf 50 ml aufgefüllt. Danach wurde für 5 min entgast, um eine Blasenbildung im Sequenziergel zu vermeiden. Von der entgasteten Lösung wurden 3 ml abgenommen und durch Zugabe von 4 µl TEMED sowie 32 µl 10% APS (beides ultrapure) zum Gießen des Untergels verwendet. Sobald das Untergel auspolymerisiert war, wurden zu der verbleibenden Lösung 25 µl TEMED sowie 250 µl 10% APS gegeben. Mit Hilfe einer Spritze wurde das Gel vorsichtig gegossen. Das

auspolymerisierte Sequenziergel wurde dann in die LI-COR[®]-Apparatur gestellt und das Programm gestartet.

2.3.8.3 Durchführung der Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgt nach der Ketten-Abbruch-Methode nach Sanger und Coulson (1977). Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Sequenase Kit (s. 2.2.4.3) und nach den Herstellerangaben durchgeführt. Für die Sequenzierungsreaktion wurde folgender Ansatz in ein steriels PCR-Gefäße pipetiert.

Sequenzierungsreaktion

Plasmid-DNA	12,5 µl
Reaktions-Puffer	2 µl
Primer	1 µl
Thermo-Sequenase-DNA-Polymerase	2 µl

Pro Reaktion wurden 4 µl ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP in vier PCR-Gefäße verteilt, die mit A, C, G und T markiert waren. In diese Gefäße wurden 4 µl der angesetzten Reaktion gegeben und gemischt. Danach wurden die PCR-Gefäße in das PCR-Gerät gestellt und das Programm gestartet.

Phase	Temperatur	Zeit	Zahl der Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 s	1
Denaturierung	95 °C	30 s	45-50
Annealing des Primers	spez.	30 s	
Verlängerungsreaktion	72 °C	1 min	
Nachbehandlung	20 °C	2 min	1
Endtemperatur	4 °C	∞	1

Tab. 5 Programm für die Sequenzierungs-Reaktion.

Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurden 2 µl der Stopplösung (Formamidlösung mit EDTA, BPB und Xylencyanol) des Sequenase Kits zu jedem Ansatz dazugegeben. Die Proben konnten nun entweder sofort auf ein Sequenziergel aufgetragen werden, oder tiefgefroren bis zu einer Woche aufbewahrt werden. Vor dem Auftragen der Proben auf das Sequenziergel wurden diese für ca. 2 min bei 95°C denaturiert und dann 1,8 µl entnommen.

2.3.8.4 Elektrophorese von Sequenziergelen

Die Gelapparatur LI-COR[®] Inc. wurde nach der Anleitung des Herstellers zusammengesetzt und 6%ige Polyacrylamidgele, die 8,3 M Harnstoff enthielten, verwendet. Der im Gel enthaltene Harnstoff und die Wärme (ca. 50 °C), die durch die hohe Spannung während der Elektrophorese entsteht, bewirken, dass die DNA-Fragmente denaturiert bleiben.

Das auspolymerisierte Sequenziergel wurde in die Apparatur (DNA-Sequencer LI-COR[®] Modell 4000 L, MWG) eingesetzt und der Vorlauf gestartet. Nach ca. 45 min konnten dann die gekochten Proben auf das Sequenziergel aufgetragen werden und der Lauf gestartet werden. Nach ca. 12 Stunden konnte das Gel ausgewertet werden.

2.3.9 Herstellung der KdpD-Konstrukte

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pBD	KdpD Wildtyp in pBAD18, Amp ^r	Jung und Altendorf, 1998a
pMS22	KdpD-C in pT7-7, Amp ^r	Schleyer und Kuhn
pSF13	KdpD-N in pT7-7, Amp ^r	S. Facey
pSF17	KdpD-C + T7-Tag in pT7-7, Amp ^r	Facey und Kuhn, 2003
pSF27.1H	KdpD-C + T7-Tag + cytopl. N-Terminus in pT7-7, Amp ^r	S. Facey
pSF61	KdpD-N + HA-Tag + cytopl. C-Terminus in pBAD18, Amp ^r	S. Facey
pSF63	KdpD-C + cytopl. N-Terminus in pBAD18, Amp ^r	S. Facey
pSF68	KdpD-N + cytopl. C-Terminus in pT7-7, Amp ^r	S. Facey
pSF69	KdpD + HA-Tag zwischen H1 + H4; Δ H2+H3 in pBAD18, Amp ^r	S. Facey
pSF70	KdpD/ Δ H2+H3 in pBAD18, Amp ^r	S. Facey
pSF77	KdpD/H3-H4-H1-H2 (vertauschte Helices) in pT7-7, Amp ^r	S. Facey
pBAD18/22	KdpD-C in pBAD18, Amp ^r	Rothenbücher, 2000
pBAD18/42	KdpD mit Ha-Tag zwischen H1 + H2 und T7-Tag zwischen H3 + H4 in pBAD18, Amp ^r	Rothenbücher, 2000
pBAD33/13	KdpD-N in pBAD33, Cm ^r	Rothenbücher, 2000
pKF1	KdpD in pET16b, Amp ^r	Fink, 2004

Tab. 6 Beschreibung der Plasmide mit den verschiedenen KdpD-Konstrukten, die zur Verfügung gestellt wurden.

Um mehr über die Funktionsweise von KdpD zu erfahren, wurden in dieser Arbeit neue KdpD-Konstrukte hergestellt. Für die Herstellung wurden die bereits erwähnten Vektoren pT7-7 (s. 2.2.9.1), pBAD18 (s. 2.2.9.2), pQE30 (s. 2.2.9.3) und pET16b (s. 2.2.9.4) verwendet. Auch bereits bestehende KdpD-Mutanten aus verschiedenen Quellen wurden für den Konstruktionsarbeiten benötigt. Die bereits bestehenden KdpD-Mutanten sind hier in Tabelle 6 aufgelistet und wurden freundlicher Weise für die Versuche zur Verfügung gestellt.

Die in dieser Arbeit hergestellten KdpD-Konstrukte sind hier in Tabelle 7 aufgelistet. Diese neu konstruierten KdpD-Mutanten wurden auf ihre Richtigkeit hin überprüft und im Folgenden ihre Funktion genauer untersucht. So konnten die Folgen der jeweiligen Mutation in Bezug auf die Funktion des KdpD-Konstruktes festgestellt werden.

Plasmid	Eigenschaft
pMR4	KdpD + T7-Tag zwischen H3 und H4 in pT7-7, Amp ^r
pMR8	KdpD-N + <i>Bam</i> HI in pT7-7, Amp ^r
pMR10	KdpD-C + T7-Tag + cytopl. N-Terminus in pBAD18, Amp ^r
pMR14	KdpD + T7-Tag zwischen H3 und H4 in pBAD18, Amp ^r
pMR16	KdpD + T7-Tag zwischen H1 und H2 in pBAD18, Amp ^r
pMR18	KdpD-N + cytopl. C-Terminus in pBAD18, Amp ^r
pMR20	KdpD/H3-H4-H1-H2 (vertauschte Helices) in pBAD18, Amp ^r
pMR22	KdpD + <i>Bam</i> HI zwischen Helix2 und Helix3 in pBAD18, Amp ^r
pMR24	KdpD-C + N-terminales His-Tag in pQE30, Amp ^r
pMR31	Helix4 + cytopl. C-Terminus in pT7-7, Amp ^r
pMR32	Helix4 + cytopl. C-Terminus in pBAD18, Amp ^r
pMR36	Helix4 + cytopl. C-Terminus + 2 Arg in pBAD18, Amp ^r
pMR43	KdpD/ Δ 1-493 AS in pBAD18, Amp ^r
pMR44	KdpD/ Δ 1-498 AS in pBAD18, Amp ^r

Tab. 7 Beschreibung der Plasmide, die in dieser Arbeit hergestellt und für die folgenden Versuche verwendet wurden.

2.3.9.1 pMR14 (KdpD/3-Tag-4)

Um pMR8 herzustellen wurde eine QuikChange-Reaktion mit der Plasmid-DNA pSF13 und den Primern KdpD-N-BamHI-1 (5'-CTA TTT TAT GGA CGC GGA TCC TGG CCT TCA TAG CTG-3') und KdpD-N-BamHI-2 (5'-CAG CTA TGA AGG CCA GGA TCC GCG TCC ATA AAA TAG-3') durchgeführt. Somit wurde eine BamHI-Schnittstelle nach Helix 2 eingeführt (Aminosäure 446). Dadurch entstand das Zwischenprodukt **pMR8** (s. Abb. 19). Dieses wurde mit *Xba*I und *Bam*HI verdaut und über ein Agarosegel aufgereinigt (s. 2.3.3.2).

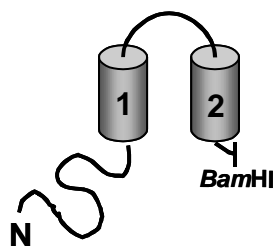


Abb. 19 Schematische Darstellung von pMR8

Um eine BamHI-Schnittstelle vor Helix 3 einzubauen, wurde ein ca. 1,4 kb großes PCR-Fragment von pSF17 (s. Tab. 6) hergestellt (s. 2.3.6). Dazu wurden die Primer KdpD-C-BamH-1 (5'-CAT ATG GGA CGC GGA TCC TGG CCT TCA GTG G-3') und C-Hind-2 (5'-CGC AGA AAG CGA CGA AAA GCT TGT TCA TCT TCA AC-3') verwendet. Dieses mit *Bam*HI und *Hind*III verdaute PCR-Fragment, bestehend aus der Helix 3 und 4 und den cytoplasmatischen C-terminalen Schleife, wurde aufgereinigt (PCR-Purification-Kit) und in das ebenfalls mit *Bam*HI und *Hind*III verdaute pMR8 Plasmid kloniert (s. 2.3.4). Somit entstand das Plasmid **pMR4**.

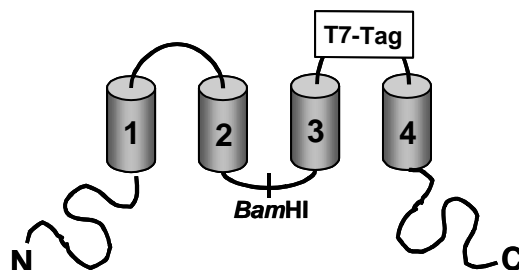


Abb. 20 Schematische Darstellung von pMR14 (KdpD/3-Tag-4)

Das KdpD-Konstrukt pMR4 wurde mit *Xba*I und *Hind*III verdaut, so dass ein ca. 2,8 kb großes Fragment entstand. Nach der Aufreinigung über ein Agarosegel wurde

dieses Fragment dann in den mit *Xba*I und *Hind*III verdauten pBAD18 Vektor (s. 2.2.9.2) ligiert (s. Abb. 29), wodurch **pMR14** entstand (s. Abb. 20).

2.3.9.2 pMR22 (KdpD+BamHI)

Zur Herstellung von **pMR22**, wurde eine *Bam*HI-Schnittstelle zwischen Helix 2 und 3 an Position 446 in pBD kloniert. Dazu wurde durch eine PCR-Reaktion ein ca. 1,4 kb großes DNA-Fragment von pSF17 (s. 2.3.6) hergestellt. Bei den für diese Reaktion verwendeten Primern handelte es sich um KdpD-C-BamH-1 (5'-CAT ATG GGA CGC GGA TCC TGG CCT TCA GTG G-3') und C-Hind-2 (5'-CGC AGA AAG CGA CGA AAA GCT TGT TCA TCT TCA AC-3'). Nach dem Verdau mit *Bam*HI und *Hind*III wurde das PCR-Fragment mit dem PCR-Purification-Kit gereinigt.

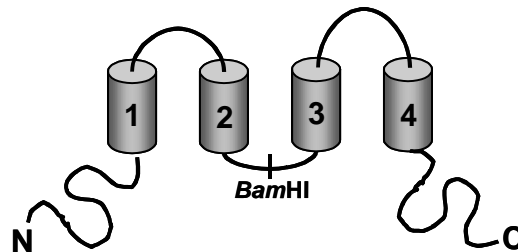


Abb. 21 Schematische Darstellung von pMR22 (KdpD+BamHI)

Das Plasmid pMR8 (s. 2.3.9.1) wurde ebenfalls mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut (s. 2.3.2), so dass ein ca. 5,2 kb großer Vektor entstand. Das PCR-Produkt wurde in diesen Vektor ligiert (s. 2.3.4). Das KdpD-Konstrukt wurde dann mit *Xba*I und *Hind*III verdaut, so dass ein ca. 2,8 kb großes Fragment entstand. Nach der Aufreinigung über ein Agarosegel wurde dieses Fragment dann in den mit *Xba*I und *Hind*III verdauten pBAD18 Vektor (s. 2.2.9.2) ligiert (s. Abb. 29), sodass pMR22 entstand (s. Abb. 21).

2.3.9.3 pMR16 (KdpD/1-Tag-2)

Zur Herstellung von **pMR16** wurde zuerst pBAD18/42 mit *Xba*I und *Bam*HI verdaut (s. 2.3.2), wodurch ein ca. 1,4 kb großes KdpD-Fragment entstand, kodierend für Helix 1 und 2 mit einem HA-Tag in der Schleife. Dieses Fragment wurde in das mit *Xba*I und *Bam*HI verdaute KdpD-Konstrukt pMR22 ligiert (s. Abb. 22).

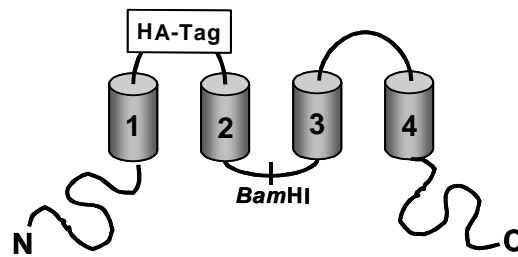


Abb. 22 Schematische Darstellung von pMR16 (KdpD/1-Tag-2)

2.3.9.4 pMR24 (KdpD-C-His₆)

Um **pMR24** herzustellen wurde pMR22 mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten (s. 2.3.2), sodass ein Fragment kodierend für Helix 3 und 4 mit dem cytoplasmatischen C-Terminus entstand. Dieses Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert (s. 2.3.3.2) und in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Hind*III geschnittenen Vektor pQE30 (s. 2.2.9.4) ligiert. Auf diese Weise wurde ein N-terminales sechser His-Tag fusioniert (s. Abb. 23).

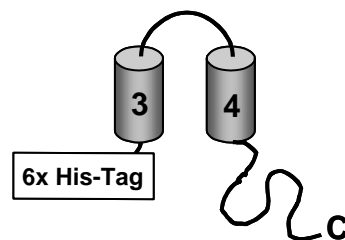


Abb. 23 Schematische Darstellung von pMR24 (KdpD-C-His₆)

2.3.9.5 pMR10 (N3-Tag-4C) und pMR18 (N1-2C)

Um **pMR10** herzustellen wurde pSF27.1H mit *Xba*I und *Hind*III verdaut (s. 2.3.2), sodass ein Fragment kodierend für dem cytoplasmatischen C-Terminus mit Helix 3 und 4 und dem cytoplasmatischen N-terminalen Teil entstand. Zusätzlich war in der Schleife zwischen den Helices ein T7-Tag platziert. Dieses DNA-Fragment wurde über ein Agarosegel gereinigt und in den mit *Xba*I und *Hind*III verdauten pBAD18 Vektor ligiert (s. Abb. 29), so dass pMR10 entstand (s. Abb. 24).

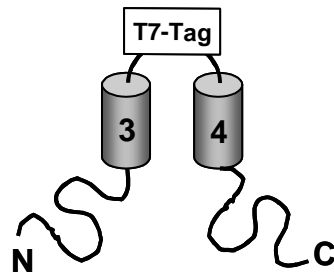


Abb. 24 Schematische Darstellung von pMR10 (N3-Tag-4C)

Nach dem gleichen Prinzip wurde mit pSF68 vorgegangen um **pMR18** herzustellen. Durch den Verdau von pSF68 mit *Xba*I und *Hind*III, entstand ein Fragment kodierend für dem cytoplasmatischen N-Terminus mit Helix 1 und 2 und dem cytoplasmatischen C-terminalen Teil. Dieses DNA-Fragment wurde ebenfalls gereinigt und in den mit *Xba*I und *Hind*III verdauten pBAD18 Vektor ligiert (s. Abb. 29), wodurch dann pMR18 entstand (s. Abb. 25).

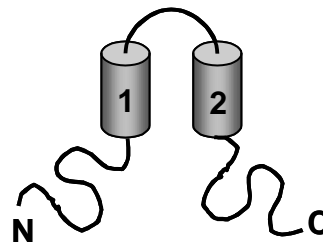


Abb. 25 Schematische Darstellung von pMR18 (N1-2C)

2.3.9.6 pMR20 (KdpD/3412)

Bei **pMR20** wurde das KdpD-Konstrukt durch einen Verdau von pSF77 mit *Xba*I und *Hind*III, sodass ein 2,8 kb großes Fragment entstand. Nach einer Reinigung über ein Agarosegel wurde das Fragment in den mit *Xba*I und *Hind*III verdauten pBAD18 Vektor ligiert (s. Abb. 29). So entstand das KdpD-Konstrukt pMR20, bei dem die Reihenfolge der Helices vertauscht wurde (s. Abb. 26).

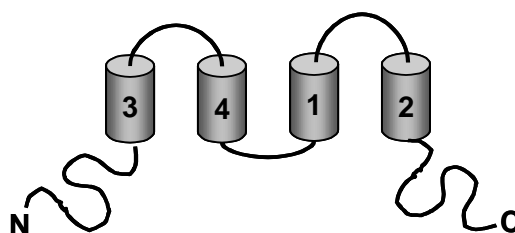


Abb. 26 Schematische Darstellung von pMR20 (KdpD/3412)

2.3.9.7 pMR32 (H4+C)

Um pMR32 herzustellen wurde zuerst das Zwischenprodukt **pMR31** konstruiert. Dafür wurde ein ca. 1,4 kb großes PCR-Fragment (s. 2.3.7) von pMS22 hergestellt. Für diese Reaktion wurden der downstream Primer C4-Nde1 (5'-TTA ATA TTG ATC ATA TGG GCA CGC TCG CCG TCT CT-3') und der upstream Primer C-Hind-2 (5'-CGC AGA AAG CGA CGA AAA GCT TGT TCA TCT TCA AC-3') verwendet. Auf diese Weise entstand eine *NdeI*-Schnittstelle bei Aminosäure 466 in dem KdpD-Fragment. Nachdem das PCR-Fragment, kodierend für Helix 4 und der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne, mit *HindIII* und *NdeI* verdaut wurde es aufgereinigt. Danach wurde es in den mit *NdeI* und *HindIII* verdauten pT7-7 Vektor (s. 2.2.9.1) ligiert.

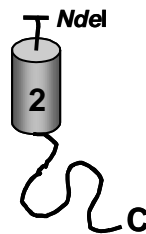


Abb. 27 Schematische Darstellung von pMR32 (H4+C)

Um das KdpD-Konstrukt **pMR32** (s. Abb. 27) herzustellen, wurde pMR31 mit *XbaI* und *HindIII* verdaut und ein ca. 1,4 kb großes Fragment über ein Agarosegel aufgetrennt und gereinigt. Dieses Fragment wurde die den mit *XbaI* und *HindIII* verdauten Vektor pBAD18 ligiert (s. Abb. 29).

2.3.9.8 pMR36 (H4+C+RR)

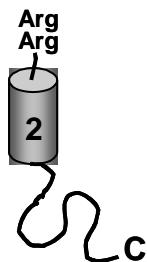


Abb. 28 Schematische Darstellung von pMR36 (H4+C+RR)

pMR36 (s. Abb. 28) wurde durch einen Aminosäureaustausch in pMR32 hergestellt. Dabei wurden zwei Arginin-Codons zwischen den Aminosäure-Positionen 474 und 475 über eine QuikChange-Reaktion (s. 2.3.7) eingeführt. Hierfür wurden der sense Primer Arg-H4a (5'-CGC TCG CCG TCT CTG GTA GGC AAT ATC TGC TGA CC-3') und der antisense Primer Arg-H4b (5'-GGT CAG CAG ATA TTG CCT ACG AGA GAC GGC GAG CG-3') verwendet.

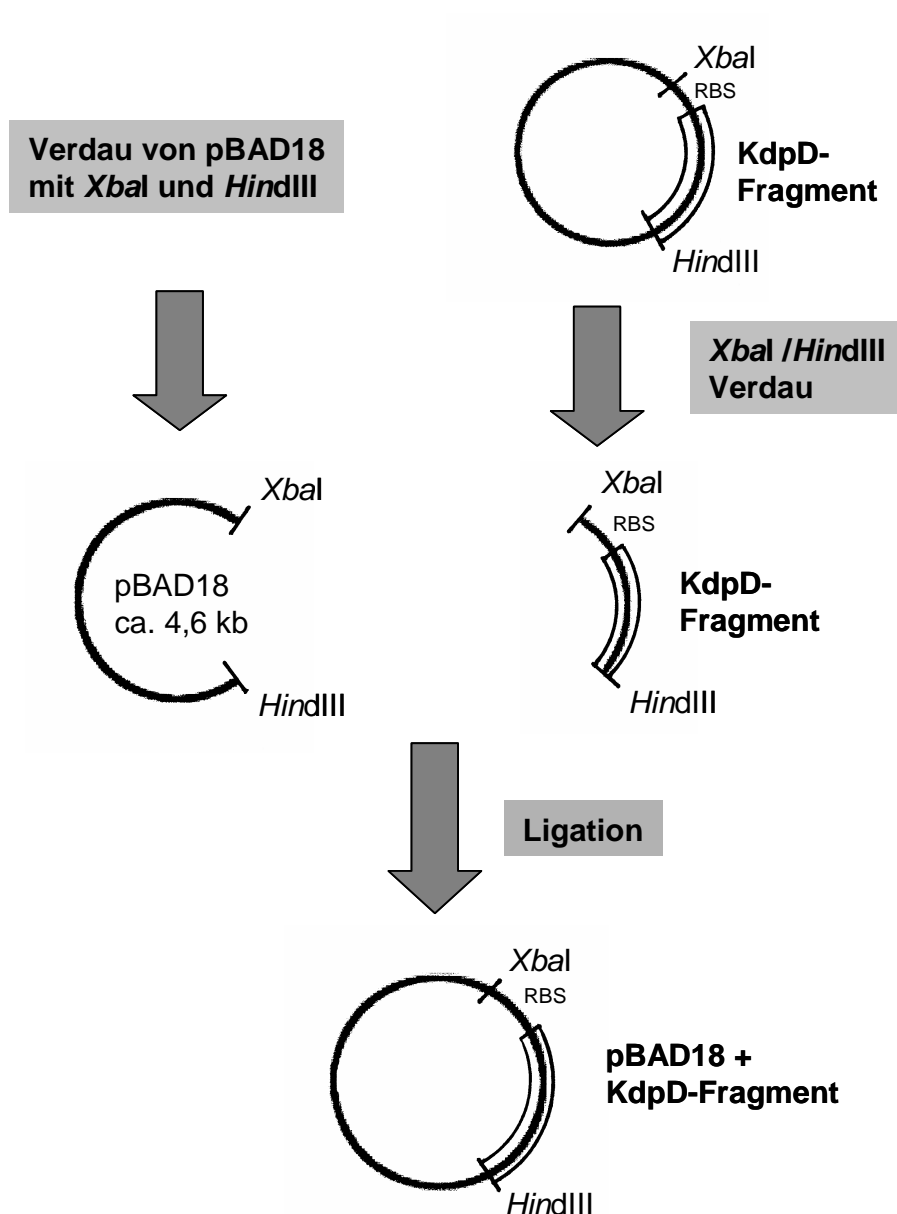


Abb. 29 Beispiel für die Herstellung eines KdpD-Fragmentes und die Klonierung in den pBAD18 Vektor.

2.3.9.9 pMR43 (C494-894)

Für die Konstruktion von **pMR43** wurden zuerst eine *SphI*-Schnittstelle an der Positionen 469 über eine QuikChange-Reaktion (s. 2.3.7) in pMR32 eingeführt. Hierfür wurden der sense Primer Sph-1-a (5'-GAT ATA CAT ATG GGC ATG CTC GCC GTC TCT GAT G-3') und der antisense Primer Sph-1-b (5'-CAT CAG AGA CGG CGA GCA TGC CCA TAT GTA TAT C-3') verwendet. Um eine weitere *SphI*-Schnittstelle an der Position 493 einzubauen wurde eine zweite QuikChange-Reaktion mit dem sense Primer Sph-2-a (5'-GGC TGG TGA TCG GCA TGC TTA CTG CTG GCG TG-3') und dem antisense Primer Sph-2-b (5'-CAC GCC AGC AGT AAG CAT GCC GAT CAC CAG CC-e3') durchgeführt. Nach einem Verdau mit *SphI*, der Reinigung über eine Agarosegel und der Religation (s. 2.3.4) entstand ein KdpD-Konstrukt (pMR43), Kodierend für die letzten 4 Aminosäuren von Helix 4 und die cytoplasmatische C-terminale Domäne (s. Abb. 30).

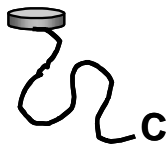


Abb. 30 Schematische Darstellung von pMR43 (C494-894)

2.3.9.10 pMR44 (C499-894)

pMR44 wurde zuerst wie bei pMR43 eine *SphI*-Schnittstelle an den Positionen 469 über eine QuikChange-Reaktion (s. 2.3.7) mit den Primern Sph-1-a und Sph-1-b in pMR32 eingeführt. Auch hier wurde noch eine zweite *SphI*-Schnittstelle eingebaut, aber an der Position 498. Hierfür wurde eine weitere QuikChange-Reaktion mit den Primern Sph-3-a (5'-GAA CCT TAC TGC TGG CAT GCG TTA TCA GGC GCG GG-3') und Sph-3-b (5'-CCC GCG CCT GAT AAC GCA TGC CAG CAG TAA GGT TC-3') durchgeführt. Das neu entstandene QuikChange-Produkt wurde mit *SphI* verdaut und über ein Agarosegel aufgereinigt. Nach der Religation (s. 2.3.7) entstand pMR44, das nur für die cytoplasmatische C-terminale Domäne kodiert (s. Abb. 31).

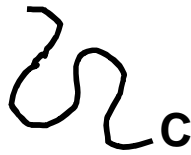


Abb. 31 Schematische Darstellung von pMR44 (C499-894)

2.3.9.11 Kontrolle der KdpD-Konstrukte

Die neu hergestellten KdpD-Konstrukte wurden alle in ihrer DNA-Sequenz überprüft. Dafür wurden zuerst die Vektoren mit den KdpD-Konstrukten in die dafür hergestellten kompetenten *E. coli* XL1-Blue Zellen (s. 2.2.8.1) transformiert (s. 2.3.5). Die Zellen wurden auf Agarplatten mit den jeweiligen Antibiotika-Zusätzen (s. Tab. 2) ausplattiert. Mit Hilfe der Minipräparation (s. 2.3.1) wurden die Plasmid-DNA isoliert und durch einen Verdau mit dem passenden Enzym linearisiert (s. 2.3.2). anhand eines Größenvergleichs auf einem Agarosegel (s. 2.3.3) wurden die linearisierten Plasmide mit den linearisierten Klonierungs-Vektoren (pBAD18, pT7-7 und pET16b) als Kontrolle in ihrer Größe überprüft. Anschließend wurde noch eine Sequenzierung (s. 2.3.8) durchgeführt.

Für die Sequenzierung der sich in einem pBAD-Vektor befindenden KdpD-Konstrukte wurden die Primer pBAD-FW, KdpD-4, KdpD-9, KdpD-7, KdpD-1, KdpD-2 und pBAD-RV (s. 2.3.8.1) verwendet. Bei den sich in einem anderen Vektor befindlichen Fragmente wurden die Primer pT7-FW und pT7-RV anstatt pBAD-FW und pBAD-RV eingesetzt. Da bei dem Vektor pET16b der Primer pT7-RV nicht verwendet werden konnte, wurde hier mit KdpD-3 gearbeitet.

Die durch die Minipräparation gewonnen Plasmide wurden für die weiteren Versuche in die dafür hergestellten kompetenten Zellen *E. coli* TKV2208 und HAK006 transformiert (s. 2.3.5). Die jeweils erhaltenen Konstrukte und die Bezeichnung der daraus resultierenden Plasmide sind in Tabelle 7 (s. S. 46) dargestellt.

2.3.10 β -Galaktosidase-Nachweis

Die β -Galaktosidase Aktivität wurde von exponentiell wachsenden Zellen als Rate der Spaltung des künstlichen Substrats oNPG (2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid) nach Miller (1972) bestimmt.

Für den Nachweis wurden die Plasmide mit den KdpD-Konstrukten in den *E. coli* Stamm HAK006 (s. 2.2.8.5) transformiert. Die Zellen wurden in Minimalmedium (s. 2.2.6) mit der entsprechenden KCl-Konzentration und dem entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37°C inkubiert. Davon wurden 20 μ l in frisches Minimalmedium überimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 gezüchtet. Danach wurden die Zellen 20 min auf Eis gestellt, um das Zellwachstum zu reduzieren. Anschließend wurden 0,1 ml Zellen entnommen und in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit dem Z-Puffer (s. 2.2.7) auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Die Kontrolle bestand aus 1 ml Z-Puffer. Für den Zellaufschluss wurden 45 μ l Chloroform und 30 μ l SDS (0,1%) dazugegeben und für 10 s auf dem Whirlmix gemischt. Danach wurde bei 28°C für 5 min geschüttelt und die Reaktion mit 200 μ l oNPG (4 mg/ml) gestartet. Nach 10 min, wenn eine Gelbfärbung zu sehen war, wurde die Reaktion mit 500 μ l 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Um die Zelltrümmer und das Chloroform zu entfernen wurde 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei einer OD von 420 nm gemessen.

Die Miller-Units wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Units} = \frac{1000 \times}{t \times v \times}$$

t = Reaktionszeit

v = Zellvolumen

2.3.11 Natriumcarbonat-Methode

Um die Membraninsertion der KdpD-Konstrukt zu untersuchen, wurde die Natriumcarbonat-Methode angewandt (Davis und Model, 1985). Für diesen Versuch wurden die Plasmide der KdpD-Konstrukte in den *E. coli* Stamm MC1061 (s. 2.2.8.4) transformiert. Die Zellen wurden über Nacht in LB-Medium (s. 2.2.6) mit den entsprechenden Antibiotika bei 37°C inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurde

frisches LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft. Bei einer OD_{600} von 0,2 wurde durch Zugabe von L-Arabinose (0,2%) für 3 h induziert. Von dieser Zellkultur wurde 1 ml entnommen, auf Eis gestellt und bei 7000 rpm für 3 min zentrifugiert (4°C). Das Zellpellet wurde in 300 µl Spheroplasten-Puffer (33 mM Tris; pH = 8,0; 40% Sucrose) resuspendiert. Danach wurde Lysozym (5 µg/ml) und EDTA (1 mM) zugegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Dem Ansatz wurden dann 400 µl eiskaltes H₂O und 700 µl Na₂CO₃ (0,2 M; pH = 11,5) zugegeben und nach weiteren 30 min auf Eis wurden die Zellen auf dem Whirlmix lysiert. Die Proben wurden nun für 30 min bei 30000 rpm zentrifugiert (4°C) um die Membranfraktion und die dort platzierten Proteine im Pellet zu sammeln. Die Proteine im Überstand und im Pellet wurden mit TCA gefällt (s. 2.3.14.2) und mit Hilfe der SDS-PAGE (s. 2.3.12) und Westernblot (2.3.13) analysiert.

2.3.12 SDS-Page (Laemmli, 1970)

Bei der SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein synthetisches, anionisches Detergens, das Proteine denaturiert. Durch Zugabe von Mercaptoethanol oder DTT werden mögliche Disulfidbrücken reduziert. Die SDS-Anionen binden an den Hauptketten der Proteine, wobei die hervorgerufene negative Ladung der Masse des jeweiligen Proteins ungefähr proportional ist. So kann die ursprüngliche Ladung des Proteins, aufgrund der stark negativen Ladung der SDS-Anionen, vernachlässigt werden.

Das SDS-Gel läuft in zwei Phasen. Im Sammelgel werden die Proben konzentriert und im Trenngel anschließend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anhand eines Protein-Markers kann man dann das Molekulargewicht der einzelnen Proteine abschätzen.

2.3.12.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gele bestanden aus einem 12,5% Trenngel und einem 4% Sammelgel. Die Trenngelmischung (12,5%) wurde in die vorbereitete Gießapparatur gegeben und, um eine Austrocknung zu verhindern, mit Isopropanol oder Butanol überschichtet. Zum Auspolymerisieren wurde das Gel 1 h stehen gelassen. Vor dem Gießen des Sammelgels, wurde das Isopropanol vollständig entfernt. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und polymerisierte aus.

Das Gel wurde dann in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Anoden- und Kathodenkammer mit 1x Tank-Puffer (s. 2.2.7) befüllt. Die Proteinproben wurden mit der entsprechenden Menge an SDS-Probenpuffer (1/4 Probenvolumen) versetzt, für 10 min bei 95°C gekocht und damit die Geltaschen be laden. Zusätzlich wurden 5 µl Proteinstandard (See Blue[®] Plus2-Pre-Stained Standard, Invitrogen) aufgetragen. Die Laufzeit betrug je nach Gelkonzentration 1 bis 1 ½ h bei 30 mA. Anschließend wurde das Gel entweder für den Westernblot (s. 2.3.13) verwendet oder Coomassie gefärbt.

Trenngel (12,5%)

Monomerlösung

(30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	12,5 ml
Trenngelpuffer (s. 2.2.7)	7,5 ml
SDS (10%)	0,3 ml
ddH ₂ O	9,6 ml
APS (10%)	100 µl
TEMED	20 µl

Sammelgel (4%)

Monomerlösung

(30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	2,66 ml
Sammelgelpuffer (s. 2.2.7)	5 ml
SDS (10%)	0,2 ml
dd H ₂ O	12 ml
APS (10%)	50 µl
TEMED	10 µl

2.3.12.2 Coomassie-Färbung

Bei der Coomassie Färbung wird ein saures Medium benötigt, um eine elektrostatische Anziehung zwischen den Farbstoffmolekülen und den Aminogruppen der Proteine zu erzeugen. Der Farbstoff-Protein-Komplex wird durch die ionischen Anziehungskräfte und durch die Van der Waals Kräfte gebildet, wobei diese Bindungen unter nicht optimalen Bedingungen vollständig reversibel ist.

Die SDS-Gele wurden in der Färbelösung für ca. 1 min in der Mikrowelle erhitzt und dann ca. 1 h vorsichtig geschüttelt. Der nichtgebundene Farbstoff wurde mit der Entfärbelösung entfernt. Danach wurden die Gele entweder in einer Wasser-Glycerol-Lösung aufgehoben, oder auf dem Geltrockner für 3 h bei 70°C getrocknet.

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue	0,025%
Methanol	40%
Essigsäure	7%

Entfärbelösung

Methanol	40%
Essigsäure	7%

2.3.13 Westernblot (Immunblot)

Um bestimmte Proteine identifizieren zu können wurde ein Westernblot (semidry) durchgeführt. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen (Towbin *et al.*,1979).

2.3.13.1 Westernblot semidry

Bei dieser Methode wurde der Proteintransfer vom SDS-Gel auf die Membran über einen Sandwichaufbau durchgeführt:

- Anoden-Deckel
- 2 Whatmanfilter (GB 004 Gel Blotting Papier)
- Nitrocellulosemembran
- SDS-Gel
- 2 Whatmanfilter
- Kathoden-Boden

Die in Transferpuffer (s. 2.2.7) getränkten Whatmanfilter, die Membran und das Gel wurden blasenfrei gestapelt. Geblottet wurde für ca. 80 min bei 250 mA.

Die auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine wurden mit der Ponceau-S-Lösung gefärbt, so dass die Banden des Größenstandards markiert werden konnten. Durch Waschen mit H₂O erfolgte die Entfärbung.

Anschließend wurde die Membran für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C in Lösung A (5 g Magermilchpulver in 100 ml 1×TBS) inkubiert, wodurch die unspezifischen Bindungsstellen der Antikörper auf der Membran blockiert wurden.

Der erste Antikörper (Anti-KdpD oder Anti-His) wurden mit 1×TBS verdünnt. Dabei wurde Anti-KdpD auf 1: 10000 und Anti-His auf 1:3000 verdünnt. Die Membran wurde darin 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde mit 1×TBS (s. 2.2.7) überschüssiger Antikörper gewaschen. Mit dem zweiten Antikörper (Anti-Maus oder Anti-Rabbit) wurde die Membran 1 Stunde bei RT inkubiert. Dafür wurde der Anti-Mouse für den His-Antikörper auf 1: 5000 mit 1×TBS verdünnt und der Anti-Rabbit für den KdpD-Antikörper auf 1:10000. Zum Schluss wurde mit 1×TBS gewaschen. Die Banden auf der Membran wurden mit Hilfe der ECL-Methode (s. 2.3.13.2) sichtbar gemacht.

Ponceau-S-Lösung

Ponceau-S Farbstoff	0,1%
Essigsäure	5%

2.3.13.2 ECL

Das ECL-Reaktionskit (s. 2.2.4.3) bietet einen empfindlichen Nachweis über Chemilumineszenz. ECL steht für „Enhanced chemiluminescence“.

Peroxidasemarkierte Antikörper katalysieren die Oxidation von Luminol und lösen damit die Lumineszenz aus. Das entstehende Licht wird über einen Blaulicht empfindlichen Film sichtbar gemacht.

Die zwei Lösungen des ECL-Kit wurden 1:1 gemischt und die Nitrocellulosemembran darin 1 min inkubiert. Danach wurde die Membran für 1 bis 15 min auf den Film gelegt. Nach der Entwicklung des Films konnte man die Antikörper gebundenen Proteine als schwarze Bande sehen.

2.3.14 Proteinexpression in *E. coli*

2.3.14.1 Arabinose-Induktion von Proteinen

Die Plasmide pBAD18 und pBAD33 beinhalten einen induzierbaren Arabinose-Promotor. Diese Plasmide mit den verschiedenen Konstrukten von KdpD werden in die *E. coli* Stämme TKV 2208 und HAK006 transformiert.

Die *E. coli* Zellen wurden in 2 ml LB-Medium (*E. coli* HAK006) oder KML-Medium (*E. coli* TKV2208) mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Von der Übernachtskultur wurden 20 µl in neues Medium (2 ml) überimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,2 wurden 0,2% L-Arabinose-Lösung zugegeben. Nach 3 Stunden bei 37°C wurden die Zellen für die TCA-Fällung geerntet.

2.3.14.2 TCA-Fällung

Bei der TCA-Fällung wurden die Proteine zur Konzentrierung und zur Entfernung von Salzen mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu werden 400 µl Zellen einer Übernachtskultur abzentrifugiert und das Pellet mit Tris/Sucrose (10 mM Tris/HCl pH = 7,5; 25% Sucrose) resuspendiert. Nach Zugabe der TCA (Endkonzentration 10%) wird auf Eis für 30 min inkubiert. Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert und das Pellet, zur Entfernung der Säurereste, zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 30 µl 1×SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 7 min bei 95 °C gekocht. Von der Probe werden dann 15 µl auf ein SDS-Gel zur Proteinauftrennung gegeben.

2.3.14.3 Expression von KdpD-C

Zur Überexpression des KdpD-C Proteins, wurde *kdpD-C* in den Expressionsvektor pQE30 (s. 2.2.9.3) kloniert. Dadurch wurde das Protein mit einem N-terminalen 6× His-Tag fusioniert, das später die Reinigung des Proteins über eine Ni-NTA ermöglichte. Die Überexpression des Proteins erfolgte in dem *E. coli* Stamm M15 (pREP4) (s. 2.2.8.3). Das zusätzliche Plasmid pREP4 reduziert die Expression des Membranproteins, da eine zu starke Überexpression toxische Auswirkungen auf die Zellen hat.

Der Expressionsvektor pQE30 besitzt einen T5-Promotor des Bakteriophagen T5, der sich in seiner Sequenz von üblichen prokaryotischen Promotoren unterscheidet und dadurch nicht von bakteriellen Polymerasen erkannt wird. Das zur Expression

benötigte T5-RNA-Polymerase Gen ist stabil im bakteriellen Chromosom von *E. coli* M15 integriert und steht unter der Kontrolle des Lactosepromotors. Durch Zugabe von IPTG wird Genexpression induziert.

Eine frisch transformierte Bakterienkolonie wurde in 2 ml antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit dieser Übernachtskultur wurde 1 l frisches LB-Medium (Ampicillin Endkonzentration: 100 µg/ml; Kanamycin Endkonzentration: 25 µg/ml, 15% Glucose) angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 wurde mit 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Die Induktion erfolgte bei ca. 10°C über Nacht unter schütteln. Durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 15 min wurden die Zellen geerntet.

Die Zellpellets wurden auf Eis in eiskalter 25% Sucrose in Tris/HCl (20 mM Tris/HCl pH 8,0; 25% Sucrose; pH 7,5) resuspendiert und zweimal mit der French Press bei 8000 lbs/inch² = 513 psi aufgeschlossen. Pro 10 ml Volumen wurden 10 µl DNase (Konzentration: 2,5 mg/ml) und 150 µl 1 M MgCl₂ zugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 45 000 rpm und 4°C 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4°C aufbewahrt und das Pellet in 1× PBS (s. 2.2.7) mit 0,3 M NaCl resuspendiert.

2.3.14.4 Expression von KdpD

Um ein N-terminales 10× His-Tag an die Wild-Typ Sequenz von *kdpD* zu fusionieren, wurde das Gen in den Expressionsvektor pET16b (s. 2.2.9.4) kloniert. Die Expression wurde in dem *E. coli* Stamm C41(DE3), der das Gen für die T7-RNA-Polymerase stabil in seinem Genom integriert hat (s. 2.2.8.2), durchgeführt. Das Gen steht unter der Kontrolle des *lac*-Repressors und wird durch Zugabe von IPTG induziert.

Eine frisch transformierte Bakterienkolonie wurde in 2 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit 1% Glucose gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG initiiert. Die Induktion erfolgte über Nacht bei ca. 10°C unter schütteln. Durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 15 min wurden die Zellen geerntet.

Das Zellpellet wurde in eiskalter 25% Sucrose in Tris/HCl (20 mM Tris/HCl pH = 8,0; 25% Sucrose; pH 7,5) resuspendiert. Pro 1 ml Volumen wurden 10 µl Lysozym (Konzentration: 2,5 mg/ml) und 250 mM EDTA (pH = 8,0) zugegeben und der Ansatz

1 h auf Eis inkubiert. Danach wurden 1 μ l PMSF (20 mg/ml in Isopropanol) pro 1 ml Volumen und 1 mM DTT (in H₂O) zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (Mikrospitze Stufe 2,5 bei 50% duty) für 2 min auf Eis.

Zu den aufgeschlossenen Zellen wurden 1 μ l DNase (Konzentration 2,5 mg/ml) pro 1 ml Volumen und 15 mM MgCl₂ zugegeben und bei 50000 rpm für 40 min zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde bei 4°C aufbewahrt und das Pellet in 1× PBS (s. 2.2.7) mit 1 mM DTT resuspendiert.

2.3.15 Solubilisierung von Membranproteinen

Um die integralen Membranproteinen weiter zu untersuchen, müssen diese zunächst in Lösung gebracht werden. Mit Hilfe von Detergenzien, die ähnlich wie Lipide, amphiphil sind, werden die wasserunlöslichen Proteine aus der Membran gelöst.

Detergenzmoleküle, die in Form von Mizellen aggregieren, sind molekulare Zwitter aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil. Die hydrophoben Reste der Detergenzmoleküle lagern sich an hydrophobe Stellen der Proteine, wie zum Beispiel Transmembranbereiche, an und verdrängen dabei teilweise die Phospholipide. Haben sich genügend Detergenzmoleküle angelagert, geht das Membranprotein in Lösung und liegt als Komplex aus Detergenz, Phospholipid und Protein vor. Die Anteile der Komponenten hängen hauptsächlich vom eingesetzten Detergenz und dessen Konzentration ab.

Für eine erfolgreiche Solubilisierung muss die Detergenzkonzentration größer als die kritische mizelläre Konzentration (CMC) sein. Die CMC beschreibt die Detergenzkonzentration oberhalb derer die Mizellenbildung eintritt. Unterhalb dieses kritischen Werts liegen die Moleküle in monomerer Lösung vor. Parameter wie Temperatur, Puffer-pH oder Ionenstärke des Puffers beeinflussen die CMC.

2.3.15.1 Solubilisierung von KdpD-C

Mit einer Sarcosyl-Konzentration von 1,5% wurde das KdpD-C Protein für 30 min bei 4°C solubilisiert. Anschließend wurden die Proteine zusätzlich im Dounce-Homogenisator solubilisiert und bei 45000 rpm für 30 min zentrifugiert (4°C). Dem Überstand, mit den solubilisierten Proteinen, wurden 10 mM Imidazol zugegeben. Das Pellet wurde in 1× PBS (s. 2.2.7) mit 0,3 M NaCl resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.3.15.2 Solubilisierung von KdpD

Dem resuspendierte Pellet wurde 2% Sarcosyl zugegeben und für 30 min bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellen im Dounce-Homogenisator solubilisiert und bei 50000 rpm für 30 min zentrifugiert (4°C). Der Überstand, der die solubilierten Proteinen enthielt, wurde mit 10 mM Imidazol versetzt, das Pellet in 1× PBS (s. 2.2.7) mit 1mM DTT resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.3.16 Proteinreinigung

Mit Hilfe eines fusionierten His-Tags lässt sich das zu untersuchende Protein über eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (immobilized metal affinity chromatography = IMAC) reinigen. Das Kation Ni^{2+} ist an eine Agarosematrix mit Nitrilotriessigsäure (NTA) als Ankermolekül gebunden. Vier von sechs Bindungsstellen sind von der Säuregruppe der NTA besetzt, die verbleibenden zwei Bindungsstellen interagieren mit der Imidazolgruppe des Histidinrestes. Die Durchführung der IMAC erfolgte im sogenannten Batch-Verfahren. Um unspezifisch gebundene Proteine und Kontaminationen zu entfernen, wurde mit Puffern mit niedriger Imidazolkonzentration gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit Imidazol, das das His-Tag-fusionierte Protein von der Ni-NTA-Matrix verdrängt.

2.3.16.1 Reinigung von KdpD-C

Die Ni-NTA-Agarose wurde zweimal mit 1× PBS (s. 2.2.7) mit 0,3 M NaCl äquilibriert und jeweils für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der solubilierte, mit Imidazol versetzte Überstand, wurde mit der Matrix gemischt und 1 h unter Drehen bei ca. 10°C inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose mit dem gebundenen Protein in eine Säule gepackt. Der Durchlauf mit den nichtgebundenen Proteinen wurde aufgefangen. Die Säule wurde zuerst mit Waschpuffer1 und dann Waschpuffer2 so lange gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm gegen Null ging. Während der Waschschrte wurde auch das Detergenz von Sarkosyl zu N-Dodecyl- β -D-maltosid ausgetauscht. Danach wurde das His-Tag-fusionierte Protein mit dem zehnfachen Säulenvolumen an Elutionspuffer eluiert und in 3 ml Fraktionen gesammelt. Der gesamte Vorgang fand bei ca. 10°C statt und die Proben waren immer auf Eis.

Waschpuffer1

Sarkosyl	2%
Imidazol	5 mM
10x PBS	20 ml
pH 8,0	

Waschpuffer2

N-Dodecyl- β -D-maltosid	0,02%
Imidazol	15 mM
10x PBS	20 ml
pH 8,0	

Elutionspuffer

N-Dodecyl- β -D-maltosid	0,02%
Imidazol	100 mM
10x PBS	10 ml
pH 8,0	

2.3.16.2 Reinigung von KdpD

Die Ni-NTA wurde zweimal mit 1x PBS (s. 2.2.7) äquibriert und anschließend mit den solubilisierten Proteinen gemischt. Die Inkubation von Proteinen und Ni-NTA erfolgte im Batch-Verfahren für 1 h bei ca. 10°C unter Drehen. Die Probe wurde auf eine Säule überführt und der Durchlauf aufgefangen. Die Säule wurde zuerst mit Waschpuffer 1 und dann mit Waschpuffer 2 gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm gegen Null ging. Das gebundene KdpD Protein wurde mit dem Elutionspuffer von der Säule eluiert und in 3 ml Fraktionen gesammelt.

Der gesamte Vorgang fand bei ca. 10°C statt und die Proben waren immer auf Eis.

Waschpuffer1

Sarkosyl	1%
Imidazol	10 mM
10x PBS	20 ml
pH 8,0	

Waschpuffer²

N-Dodecyl- β -D-maltosid	0,5%
Imidazol	10 mM
10x PBS	20 ml
pH 8,0	

Elutionspuffer

N-Dodecyl- β -D-maltosid	0,5%
Imidazol	200 mM
10x PBS	10 ml
pH 8,0	

2.3.16.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine wurde mit Hilfe der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Dazu wurde zunächst eine Eichgerade mit den entsprechenden BSA-Standards aus einer Stammlösung (2 mg/ml) hergestellt. Das Bradford-Farbreagenz wurde 1:5 mit ddH₂O verdünnt. Zu 1 ml verdünntem Farbreagenz wurden 20 μ l der BSA-Standards gegeben. Die Extinktion wurde bei 595 nm gegen den Nullwert (20 μ l ddH₂O mit 1 ml verdünntem Bradford-Reagenz) gemessen.

Von der zu bestimmenden Proteinlösungen wurden 20 μ l mit 1 ml Farbreagenz gemischt und gegen den Probenleerwert (20 μ l Puffer mit 1 ml Farbreagenz) gemessen. Anhand der Eichkurve konnte die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

2.3.17 Blue Native Gel

Bei nativen Gelen erfolgt die Auftrennung, im Gegensatz zu den SDS-haltigen Gelen, die denaturierte Proteine nach der Größe auftrennen, nach Proteinkomplexen. Diese Methode wurde ursprünglich von Schägger zur Auftrennung von Proteinkomplexen aus Mitochondrien (Schägger und von Jagow, 1991; Schägger *et al.*, 1994; Brookes *et al.*, 2002) entwickelt. Dabei wird die für die Elektrophorese nötige negative Ladung durch einen Coomassie-Farbstoff an die Proteine gebracht. Außerdem übernimmt der Farbstoff bei Eintritt in das Gradienten-Polyacrylamid-Gel die Aufgabe des Extraktions-Detergenzes und verhindert durch elektrische Abstoßung eine ungewollte Proteinaggregation.

2.3.17.1 Herstellung des Blue Native Gels

Um eine optimale Auftrennung der Proteinkomplexe zu gewährleisten, wurde ein Gradientengel (4% bis 16,5% Acrylamid) verwendet. Das Gel wurde mit Hilfe des Gradientenmischers aus eiskalten Lösungen gegossen und mit Propanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren (ca. 1 h) wurde das Propanol sorgfältig entfernt und das Sammelgel gegossen.

Trenngel (4%)

AB-Mix (s. 2.2.7)	0,75 ml
Gel-Puffer (3x) (s. 2.2.7)	3 ml
APS (10%)	38 µl
TEMED	3,8 µl
mit ddH ₂ O auf 9 ml auffüllen	

Trenngel (16,5%)

AB-Mix (s. 2.2.7)	3,05 ml
Gel-Puffer (3x) (s. 2.2.7)	3 ml
Glycerin	1,8 g
APS (10%)	30 µl
TEMED	3 µl
mit ddH ₂ O auf 9 ml auffüllen	

Sammelgel

AB-Mix (s. 2.2.7)	0,3 ml
Gel-Puffer (3x) (s. 2.2.7)	1,25 ml
ddH ₂ O	2,2 ml
APS (10%)	30 µl
TEMED	12 µl

Nach dem Gießen des Sammelgels, wurde der Kamm eingeführt und das Gradientengel 2 Stunden zum Auspolymerisieren stehen gelassen.

2.3.17.2 Vorbereitung der Proben

Von den induzierten und abzentrifugierten KdpD-C-His Zellen (s. 2.3.14.3) wurden 20 µl entnommen. Diese Zellen wurden mit den Lyspuffern (s. 2.2.7) mit den verschiedenen Detergenzien versetzt. Dieser Ansatz wurde kurz gemischt und dann 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 7 µl Probenpuffer (s. 2.2.7) versetzt und damit das Blue Native Gel beladen. Als Marker dienten die Proteine BSA (66 kDa), ADH (150 kDa) und Apoferritin (440 kDa).

2.3.17.3 Elektrophorese von Blue Native Gelen

Das Blue Native Gel wurde in die spezielle, wassergekühlte Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit den Proben (s. 2.3.17.2) beladen. In die untere Kammer wurde der Kathodenpuffer A (s. 2.2.7) eingefüllt und in den oberen Tank der Anodenpuffer. Das Gel lief zuerst bei 100 V, bis die Proben die Front des Trennegels erreicht hatten, dann bei 500 V und 15 mA limitierend. Nach 1/3 Lauf wurde der Kathodenpuffer A gegen den Kathodenpuffer B (s. 2.2.7) ausgetauscht.

2.3.17.4 Westernblot von Blue Native Gelen

Der Westernblot von Blue Nativen Gelen wird prinzipiell wie der Westernblot von SDS-Gelen aufgebaut (s. 2.3.13). Hierbei wird jedoch eine PVDF-Membran verwendet. Diese muss vor dem Blotten in Methanol getränkt werden. Danach wurde die Membran zweimal mit Wasser gewaschen und dann mit Transferpuffer (s. 2.2.7) getränkt.

Nach dem Blotten war die PVDF-Membran durch das Blue Native Gel blau gefärbt. Zum Entfärben wurde die Membran mit Methanol gewaschen. Mit Hilfe der Ponceau-S-Färbung konnten die Banden des Größenstandards markiert werden. Durch Waschen mit H₂O erfolgte die Entfärbung.

Der Antikörper-Nachweis wurde wie bei den geblotteten SDS-Gelen durchgeführt (s. 2.3.13.1). Die geblotteten und antikörpermarkierten Proteine wurde mit Hilfe der ECL-Reaktion (s. 2.3.13.2) sichtbar gemacht.

2.3.17.5 2D-Gelelektrophorese des Blue Native Gels

Um die durch die Blue Native Gelelektrophorese festgestellten Komplexe genauer zu untersuchen, wurden diese über eine SDS-Gelelektrophorese denaturiert und zweidimensional aufgetrennt.

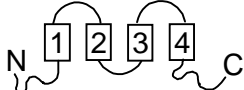
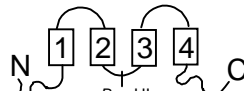
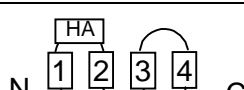
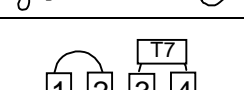
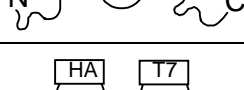
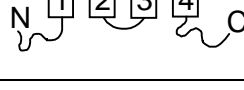
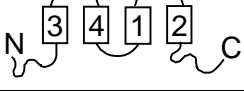
Hierfür wurde ein 12,5% SDS-Trenngel (s. 2.3.12.1) gegossen. Der interessante Bereich, mit dem Komplexen, wurde aus dem Blue-Native-Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in das SDS-Sammelgel (s. 2.3.12.1) miteingegossen. Danach wurde die Gelelektrophorese (s. 2.3.12.1) und anschließende eine Westernblot (s. 2.3.13) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE





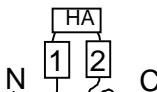
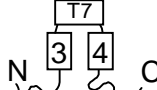

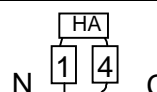




Um mehr über die Signal-Erkennung und -Weiterleitung der Sensorkinase KdpD des KdpD-Systems herauszufinden wurden KdpD-Konstrukte mit verschiedenen Mutationen hergestellt. Dabei wurden Helices entfernt oder vertauscht. Diese Konstrukte wurde auf ihre Funktion hin überprüft und dann die Aktivität der verschiedenen KdpD-Konstrukte verglichen. Auf diese Weise sollten die für die Signaltransduktion essentiellen Regionen der Sensorkinase identifiziert werden.

3.1 KdpD-Konstrukte für die folgenden Versuche

Hier sind die KdpD-Konstrukte, die in den folgenden versuchen verwendet wurden, aufgelistet. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht der Plasmidnamen, Konstruktnamen und eine schematische Darstellung der KdpD-Konstrukte. In den weiteren Versuchen werden hauptsächlich die Konstruktnamen verwendet.

Plasmid	Konstruktnamen	schematische Darstellung
pBD	KdpD	
pMR22	KdpD+BamHI	
pMR16	KdpD/1-Tag-2	
pMR14	KdpD/3-Tag-4	
pBAD18/42	KdpD+2Tags	
pMR20	KdpD/3412	
pMR24	KdpD-C-His ₆	

Tab. 8a Plasmidnamen, Konstruktnamen und eine schematische Darstellung der Konstrukte, die in den weiteren Versuchen verwendet wurden.

Plasmid	Konstruktnamen	schematische Darstellung
pBAD18/22	KdpD-C	
pBAD33/13	KdpD-N	
pMR18	N1-2C	
pSF63	N3-4C	
pSF61	N1-Tag-2C	
pMR10	N3-Tag-4C	
pSF70	N1-4C	
pSF69	N1-Tag-4C	
pMR32	H4+C	
pMR36	H4+C+RR	
pMR43	C494-894	
pMR44	C499-894	

Tab. 8b Plasmidnamen, Konstruktnamen und eine schematische Darstellung der Konstrukte, die in den weiteren Versuchen verwendet wurden.

3.2 Komplementationstest

Bei dem Komplementationstest wird die Funktionsfähigkeit der KdpD-Konstrukte über ihre Fähigkeit eine *kdpD*-Deletion zu komplementieren überprüft. Hierfür wurde der *E.*

coli Stamm TKV2208 (s. 2.2.8.6) mit einer Deletion des *kdpD*-Gens in dem Epstein & Davies (1970) K0,1-Minimalmedium (s. 2.2.6) gezüchtet. In diesem Minimalmedium, mit einer sehr niedrigen K⁺-Konzentration (0,1 mM), wachsen die Zellen nur, wenn das Kdp-System funktionstüchtig ist.

3.2.1 In flüssigem K0,1-Minimalmedium

Die Funktion der KdpD-Konstrukte wurde zuerst in flüssigem K0,1-Miniamlmedium überprüft. Als Vergleich dienten der KdpD Wildtyp, KdpD-C und KdpD-N. Für den Wachstumstest wurden die Zellen mit den transformierten KdpD-Konstrukten (s. Tab. 8) in 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Die Zellen wurden vorsichtig abzentrifugiert und mit K0,1-Minimalmedium (s. 2.2.6) gewaschen. Mit diesem Ansatz wurden 2 ml K0,1-Minimalmedium im Verhältnis 1:100 angeimpft und wieder über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Am darauffolgenden Tag wurde die optische Dichte jeweils bei 600 nm gemessen.

Konstrukte (Plasmid)	OD ₆₀₀	Wachstumsergebnis
Plasmid (pBAD18)	0,16 (± 0,14)	–
KdpD (pBD)	0,89 (± 0,07)	+
KdpD+BamHI (pMR22)	0,94 (± 0,12)	+
KdpD/1-Tag-2 (pMR16)	0,89 (± 0,06)	+
KdpD/3-Tag-4 (pMR14)	0,92 (± 0,11)	+
KdpD+2Tags (pBAD18/42)	0,93 (± 0,10)	+
KdpD/3412 (pMR20)	0,97 (± 0,07)	+
KdpD-C (pBAD18/22)	0,94 (± 0,12)	+
KdpD-N (pBAD33/13)	0,06 (± 0,09)	–
N1-2C (pMR18)	0,82 (± 0,11)	+
N3-4C (pSF63)	0,89 (± 0,08)	+
N1-Tag-2C (pSF61)	0,94 (± 0,03)	+
N3-Tag-4C (pMR10)	0,87 (± 0,11)	+
N1-4C (pSF70)	0,95 (± 0,07)	+
N1-Tag-4C (pSF69)	0,87 (± 0,08)	+
H4+C (pMR32)	0,99 (± 0,06)	+
H4+C+RR (pMR36)	0,93 (± 0,03)	+
C494-894 (pMR43)	0,88 (± 0,10)	+
C499-894 (pMR44)	0,95 (± 0,11)	+

Tab. 9 Untersuchung der Funktionsfähigkeit der KdpD-Konstrukte anhand eines Wachstumstest in flüssigem K0,1-Minimalmedium.

Die Ergebnisse in Tabelle 9 zeigen, dass bis auf KdpD-N alle KdpD-Konstrukte in dem K0,1-Minimalmedium über Nacht gewachsen waren. Dies bedeutet, dass das Kdp-System funktionstüchtig war und die KdpD-Konstrukte in der Lage waren die Deletion des *kdpD* Gens in *E. coli* TKV2208 zu komplementieren.

Als Negativkontrolle wurde der Vektor pBAD18 ohne KdpD dem Wachstumsversuch unterzogen. Der Versuch wurde je KdpD-Konstrukt dreimal wiederholt und von den Ergebnissen der Durchschnitt errechnet. Die Standardabweichung wurde errechnet und in Klammern angegeben (s. Tab. 9).

3.2.2 Auf festem K0,1-Minimalmedium

Um das Ergebnis des Komplementationstestes in flüssigem K0,1-Minimalmedium zu verifizieren wurde der Versuch auch auf K0,1-Agarplatten (s. 2.2.6) durchgeführt. Hier wurden die gleichen KdpD-Konstrukte wie im flüssigen K0,1-Minimalmedium getestet.

Für die Herstellung der K0,1-Agarplatten wurde der Agar mit einer NaCl-Lösung gewaschen, um die eventuell vorhandenen Kaliumionen zum größten Teil zu entfernen. Die *E. coli* TKV2208 Zellen (s. 2.2.8.6) mit den KdpD-Konstrukte wurden wie in 3.2.1 beschrieben angezüchtet und gewaschen und dann auf K0,1-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotika (s. 2.2.10, Tab. 6 und 7) ausgestrichen. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag ausgewertet. Der Versuch wurde je KdpD-Konstrukt dreimal wiederholt. Die Ergebnisse entsprachen denen in Tabelle 9 (s. S. 71). Auch hier konnten KdpD-N und die Negativkontrolle nicht auf den K0,1-Agarplatten wachsen.

3.3 Wachstumskurve der KdpD-Konstrukte

Um die Wachstumseigenschaften der neuen KdpD-Konstrukte zu untersuchen, wurden diese in die *E. coli* TKV2208 Zellen (s. 2.2.8.6) transformiert. Die Zellen wurden dann in 2 ml K0,1-Minimalmedium (s. 2.2.6) mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Mit dieser Übernachtskultur wurde dann frisches K0,1-Minimalmedium im Verhältnis 1:100 angeimpft. Jede Stunde wurde eine Probe entnommen und die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Als Negativkontrolle diente der *E. coli* TKV2208 Stamm, bei dem die Aminosäuren 128 bis 894 des *kdpD* Gens deletiert wurden und der dadurch nicht

funktionsfähig ist. Als Vergleichskurve diente die Wachstumskurve des KdpD Wildtyps.

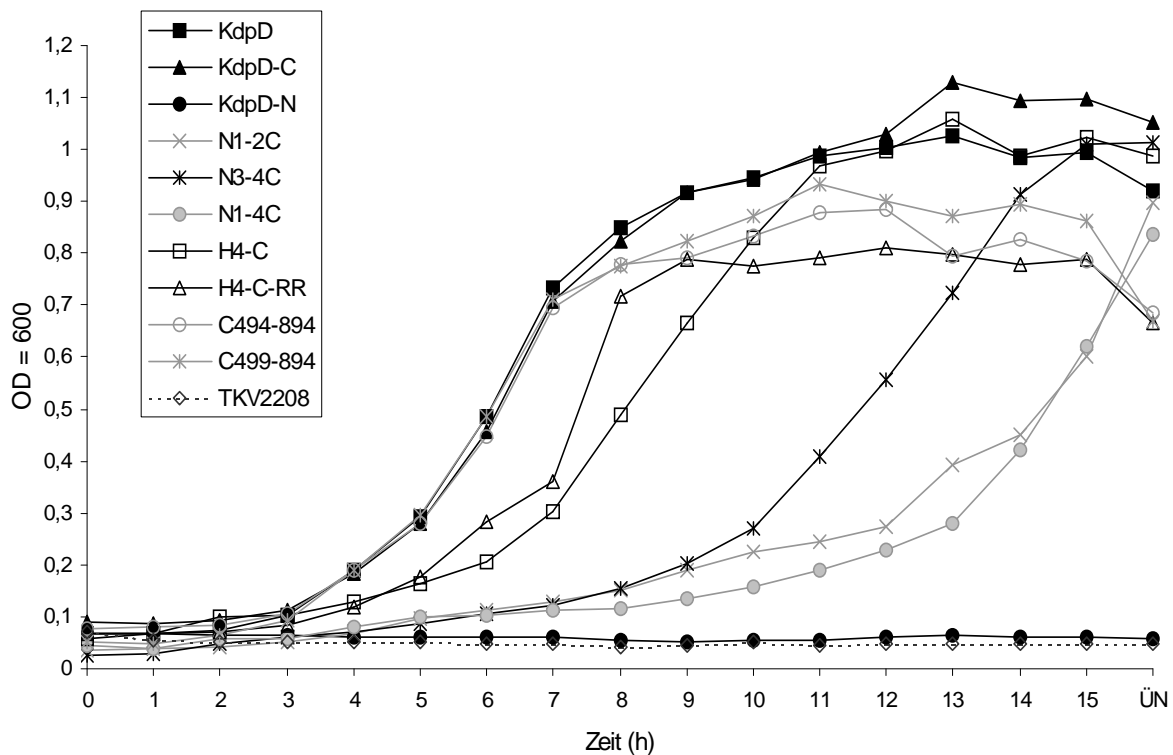


Abb. 32 Wachstumskurve der KdpD-Konstrukte in K0,1-Minimalmedium. Jede Stunde wurde eine Probe entnommen und die Zelldichte bei OD₆₀₀ bestimmt. Nach der 15 h Probenentnahme wurde dann noch zusätzlich die Zelldichte der Übernachtskultur (ÜN) gemessen.

Bis auf KdpD-N (●) und der Negativkontrolle (*E. coli* TKV2208 als ◇) konnten alle KdpD-Konstrukte (KdpD-C, H4-C, H4-C-RR, C494-894 und C499-894) in dem K0,1-Minimalmedium wachsen (s. Abb. 32). Die Wachstumskurve zeigte bei den meisten KdpD-Konstrukten eine Lag-Phase von ca. 3 h und gingen dann in die exponentielle Wachstumsphase über. Nach ca. 9 h erreichten sie die stationäre Phase.

Die Konstrukte C494-894 (○) und C499-894 (*) zeigen bis zur exponentiellen Phase eine dem Wildtyp (■) fast identische Wachstumskurve. Bei dem Übergang in die stationäre Phase erreichen sie aber nicht das Plateau des Wildtyps (OD₆₀₀ = 1), sondern bleiben auf einer niedrigeren OD₆₀₀ (= 0,9). Auch H4-C-RR (△) erreicht nicht das Plateau des Wildtyps (OD₆₀₀ = 1,0) in der stationären Phase.

Die Konstrukte N3-4C (*), N1-2C (×) und N1-4C (●) wuchsen sehr langsam. Die lag-Phase dauerte ca. 5 h und gingen dann in eine ca. zehnstündige exponentielle Wachstumsphase über. Erst nach ca. 15 h erreichten N3-4C (*), N1-2C (×) und N1-4C (●) die stationäre Wachstumsphase (s. Abb. 32).

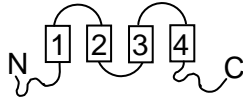
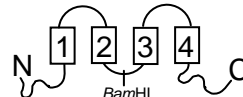
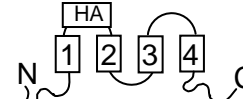
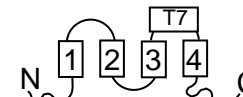
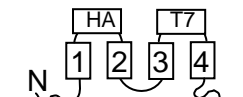
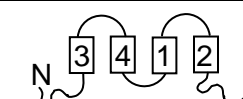
3.4 β -Galaktosidase Nachweis

Durch den β -Galaktosidase Nachweis (s. 2.3.10) kann die Aktivität der KdpD-Konstrukte überprüft werden. Die β -Galaktosidase Aktivität wird dabei in Units (Miller, 1972) angegeben.

Für diesen Versuch wurden die KdpD-Konstrukte aus Tabelle 8 (s. S. 69) verwendet und in *E. coli* HAK006 (s. 2.2.8.5) transformiert. *E. coli* HAK006 beinhaltet das funktionstüchtige *kdpE* Gen, aber nicht die *kdpABCD* Gene auf dem Chromosom. Dieser Stamm trägt ein KdpFABC Promotor *lacZ* Fusionsgen, so dass die Expression des *kdpFABC* Operons durch die β -Galaktosidase Aktivität überwacht werden kann. Das bedeutet, wenn das Kdp-System induziert wird, entsteht auch β -Galaktosidase, deren Aktivität photometrisch nachgewiesen werden kann. Dabei handelt es sich um die Menge oNPG (2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid), die durch die entstandene β -Galaktosidase in einer bestimmten Zeit umgesetzt wird. Damit *E. coli* HAK006 im Minimalmedium wachsen konnte wurde L-Prolin zugegeben.

3.4.1 Aktivität der KdpD-Konstrukte

Für diesen Versuch wurden folgende KdpD Mutanten ausgewählt:

Konstrukt-Name	Plasmid	schematische Darstellung
KdpD	pBD	
KdpD+BamHI	pMR22	
KdpD/1-Tag-2	pMR16	
KdpD/3-Tag-4	pMR14	
KdpD+2Tags	pBAD18/42	
KdpD/3412	pMR20	

Bei diesem Versuch wurde der aktive Zustand der KdpD-Mutanten und auch die Reaktion auf die steigende K^+ -Konzentration im Medium mit dem Wildtyp KdpD verglichen.

Die *E. coli* HAK006 Zellen mit den entsprechenden Plasmiden, wurden in Minimalmedium mit unterschiedlichen K^+ -Konzentrationen (0,1 mM oder 6 mM) angezüchtet. Bei einer K^+ -Konzentration von 0,1 mM ist das Kdp-System aktiv, d. h. β -Galaktosidase wird produziert. Wird die KCl-Konzentration im Medium auf 6 mM erhöht sollte das Kdp-System inaktiv sein.

Der Reaktionsansatz bestand aus 0,1 ml Zellen und 0,9 ml Z-Puffer (s. 2.2.7). Die Reaktion wurde nach 10 min gestoppt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und die β -Galaktosidase Aktivität nach der Miller-Formel berechnet (s. 2.3.10).

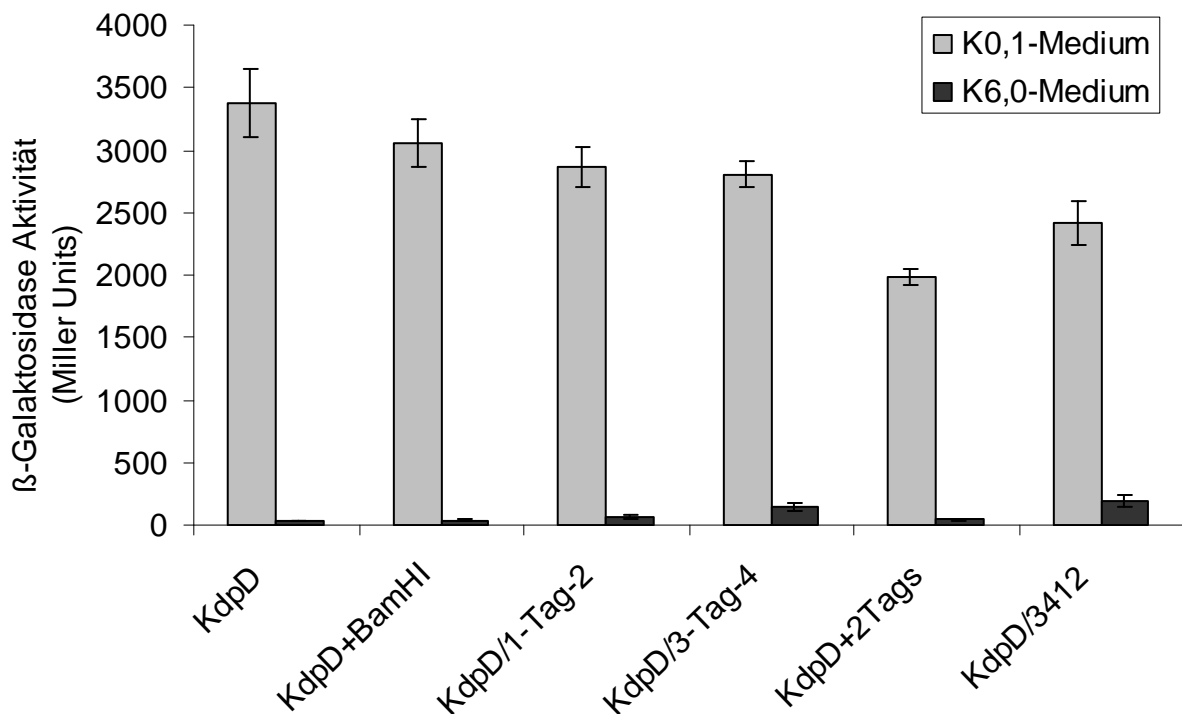


Abb. 33 β -Galaktosidase Nachweis in K0,1-Minimalmedium (hellgraue Balken) und K6,0-Minimalmedium (dunkelgraue Balken).

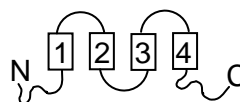
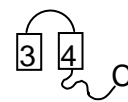
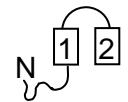
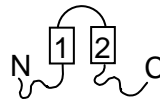
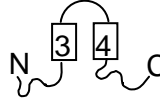
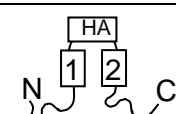
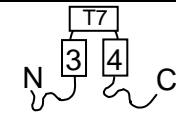
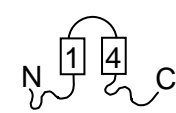
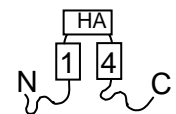
Das Wildtyp KdpD hat eine hohe Aktivität bei niedriger K^+ -Konzentration im Medium (K0,1-Medium), wird die Konzentration erhöht (K6,0-Medium) ist KdpD inaktiv (s. Abb. 33). Das Einfügen der *BamHI*-Schnittstelle zwischen Helix2 und 3 in den KdpD-Wildtyp (KdpD+*BamHI*) hat keine Auswirkung auf die β -Galaktosidase Aktivität. Auch die in die cytoplasmatischen Schleifen klonierten Tags zeigen keinen starken Effekt.

Bei KdpD/3-Tag-4 ist eine geringe Restaktivität bei 6 mM KCl im Medium zu beobachten. Nur KdpD+2Tags, bei dem in beide cytoplasmatischen Schleifen jeweils ein Tag eingeführt wurde, zeigt im Vergleich zum Wildtyp KdpD eine Verringerung der Aktivität um ca. 1000 Miller Units im K0,1-Minimalmedium (s. Abb. 33).

Das Vertauschen der Helices (KdpD/3412) macht sich in einer leichten Reduktion der Aktivität um ca. 500 Miller Units und einer erhöhten Restaktivität von ca. 200 Miller Units im K6,0-Medium im Vergleich zum Wildtyp bemerkbar.

3.4.2 Aktivität der KdpD-Konstrukte mit 2 Helices

Für diesen Versuch wurden folgende KdpD Mutanten ausgewählt:

Konstrukt-Name	Plasmid	schematische Darstellung
KdpD	pBD	
KdpD-C	pBAD18/22	
KdpD-N	pBAD33/13	
N1-2C	pMR18	
N3-4C	pSF63	
N1-Tag-2C	pSF61	
N3-Tag-4C	pMR10	
N1-4C	pSF70	
N1-Tag-4C	pSF69	

Bei diesem Versuch wurde die Auswirkung einer größeren Deletion im *kdpD* Gen auf die Aktivität der KdpD-Konstrukte untersucht. Hierfür wurden die KdpD-Mutanten mit 2 Helices ausgesucht, und ihre Reaktion auf die erhöhte K⁺-Konzentration im Medium mit den Konstrukten KdpD, KdpD-C und KdpD-N verglichen.

Die *E. coli* HAK006 Zellen mit den entsprechenden Plasmiden, wurden in Minimalmedium mit unterschiedlichen K⁺-Konzentrationen (0,1 mM oder 6 mM) angezüchtet. Der Reaktionsansatz bestand aus 0,1 ml Zellen und 0,9 ml Z-Puffer (s. 2.2.7). Die Reaktion wurde nach 10 min gestoppt.

Der Versuch wurde dreimal wiederholt und die β-Galaktosidase Aktivität nach der Miller-Formel berechnet (s. 2.3.10).

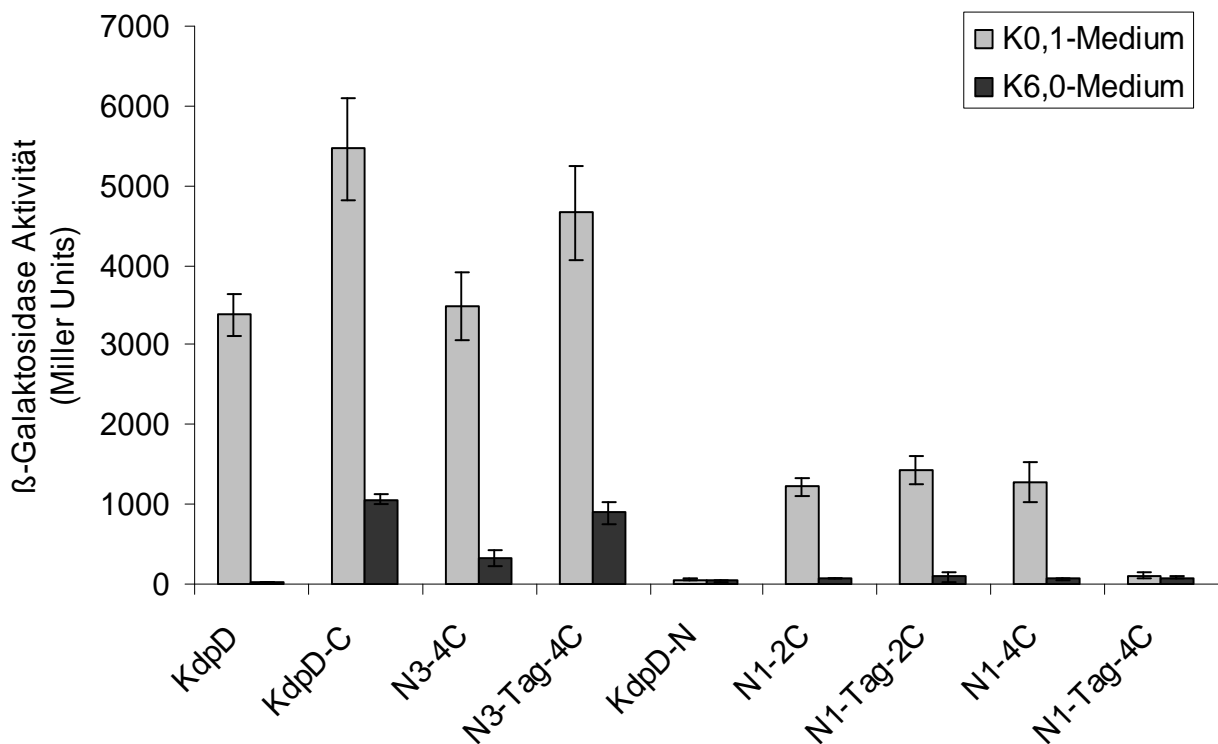


Abb. 34 β-Galaktosidase Nachweis in K0,1-Minimalmedium (hellgraue Balken) und K6,0-Minimalmedium (dunkelgraue Balken) für die KdpD-Konstrukte mit 2 Helices.

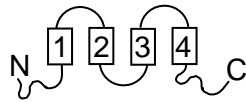
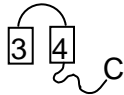




Für das KdpD-Konstrukt N3-4C wurde die cytoplasmatische N-terminale Domäne an KdpD-C kloniert (s. Abb. 34). Dadurch reduzierte sich die Aktivität von KdpD-C (ca. 5500 Miller Units) auf ein dem Wildtyp KdpD vergleichbares Level (ca. 3500 Miller Units). Bei 6 mM KCl im Medium hatte N3-4C noch eine leicht erhöhte Restaktivität (ca. 200 Units). Durch den Einbau des Tags bei N3-4C (N3-Tag-4C) wurde eine Erhöhung der Aktivität und auch der Restaktivität festgestellt.

Das inaktive KdpD-N zeigte nach dem Anhängen der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne (N1-2C) eine Aktivität, die auch auf den Anstieg der K^+ -Konzentration im Medium mit einer Reduzierung der Aktivität reagiert. Der Einbau des Tags (N1-Tag-2) hat anscheinend keine Auswirkungen auf die Aktivität (s. Abb. 34).

Auch das Konstrukt mit einer Deletion der Helix2 und 3 (N1-4C) zeigt eine dem N1-2C vergleichbare Aktivität. Nach dem Einbau des Tags (N1-Tag-4C) ist keine regulierbare Aktivität mehr nachweisbar.

3.4.3 Aktivität der KdpD-Konstrukte mit einer oder keiner Helix

Für diesen Versuch wurden folgende KdpD Mutanten ausgewählt:

Konstrukt-Name	Plasmid	schematische Darstellung
KdpD	pBD	
KdpD-C	pBAD18/22	
H4+C	pMR32	
H4+C+RR	pMR36	
C494-894	pMR43	
C499-894	pMR44	

Bei dieser Versuchsreihe wurde die Aktivität der KdpD-Konstrukte mit nur noch einer oder keiner Helix untersucht.

KdpD und KdpD-C wurden hier als Kontrolle und zum Vergleich der Funktion in die Versuchsreihe mit aufgenommen. Der Reaktionsansatz bestand aus 0,1 ml Zellen (*E. coli* HAK 006) und 0,9 ml Z-Puffer (s. 2.2.7). Die Reaktion wurde nach 10 min gestoppt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und die β -Galaktosidase Aktivität nach der Miller-Formel berechnet (s. 2.3.10).

Das Konstrukt H4+C, welches aus der Helix 4 und der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne besteht, zeigte bei 0,1 mM KCl im Medium eine Aktivität von ca. 2000 Miller Units und schaltete bei Erhöhung der Konzentration ab (s. Abb. 17). Durch das Anhängen zweier Argininreste an den N-Terminus (H4+C+RR), sollte der Membraneinbau verhindert werden. Im aktiven Zustand, das heißt bei einer niedrigen K⁺-Konzentration im Medium, ist die Aktivität dem Wildtyp KdpD vergleichbar. Wird die K⁺-Konzentration im Medium erhöht, so bleibt eine relativ hohe Restaktivität (ca. 600 Miller Units).

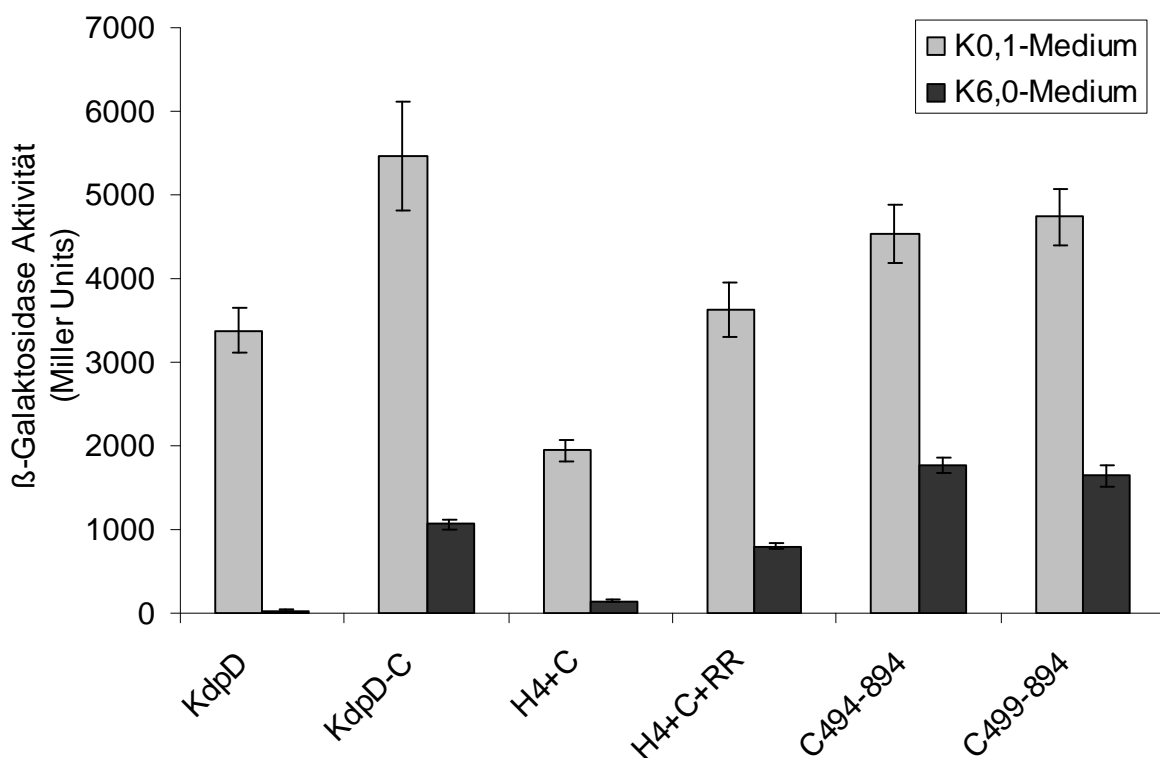


Abb. 35 β -Galaktosidase Nachweis in K0,1-Minimalmedium (hellgraue Balken) und K6,0-Minimalmedium (dunkelgraue Balken) für die KdpD-Konstrukte mit einer oder keiner Helix.

Nach der teilweisen (C494-894) oder kompletten Deletion der Helix4 (C499-894), so dass nur noch der cytoplasmatische C-Terminus übrig ist, zeigte sich eine Aktivität, die mit KdpD-C verglichen werden kann. Beide Konstrukte haben eine hohe Aktivität bei einer niedrigen K⁺-Konzentration (ca. 4500 bis 5000 Miller Units) und zeigen bei einer Erhöhung der Konzentration eine hohe Restaktivität (ca. 2000 Miller Units). Dennoch ist deutlich erkennbar, dass diese Konstrukte (C494-894 und C499-894) immer noch den Anstieg der K⁺-Konzentration registrieren und ihre Aktivität reduzieren (s. Abb. 34).

3.5 Membranlokalisierung der KdpD-Konstrukte

Um die Membranlokalisierung der für die weiteren Untersuchungen wichtigen KdpD-Konstrukte zu untersuchen, wurde die Natriumcarbonat-Methode (s. 2.3.11) angewandt. Bei dieser Methode werden nach dem Zellaufschluss die Proteine, die sich an die Membran angelagert haben mit Hilfe von Natriumcarbonat (0,2 M) abgewaschen. Durch Zentrifugation gehen die abgewaschenen Proteine in den Überstand über, die Membranproteine befinden sich im Pellet.

Für diesen Versuch wurden folgenden KdpD-Konstrukte verwendet:

Konstrukt-Name	Plasmid
KdpD	pBD
KdpD-C	pBAD18/22
KdpD-N	pBAD33/13
N1-2C	pMR18
N3-4C	pSF63
N1-4C	pSF70
H4+C	pMR32
H4+C+RR	pMR36
C494-894	pMR43
C499-894	pMR44

Die *E. coli* MC1061 Zellen mit den transformierten Plasmiden wurden über Nacht in LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum bei 37°C inkubiert. Mit dieser Übernackkultur wurde frisches LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,2 wurde durch Zugabe von L-Arabinose (0,2%) für 3 h induziert (s. 2.3.11). Die Zellen wurden dann abzentrifugiert, aufgeschlossen und mit Na₂CO₃ behandelt. Durch eine Ultrazentrifugation wurden die löslichen Proteine im Überstand (Ü) und die Membranproteine im Pellet (P) getrennt.

Die Proteine aus Pellet und Überstand wurden mit TCA gefällt (s. 2.3.13.2) und auf ein SDS-Gel (s. 2.3.12) aufgetragen. Mit Hilfe des Westernblots (s. 2.3.13) und des KdpD-Antikörpers (s. 2.2.5) konnten die Konstrukte nachgewiesen werden.

Alle KdpD-Konstrukte wurden expremiert. KdpD-N und N3-4C zeigen, mit dem KdpD Wildtyp verglichen, ein leicht reduziertes Expressionslevel. Dagegen wurden die KdpD-Konstrukte N1-2C, N1-4C, H4+C, H4+C+RR, C494-894 und C499-894 sehr stark expremiert, verglichen mit dem Wildtyp KdpD (s. Abb. 36).

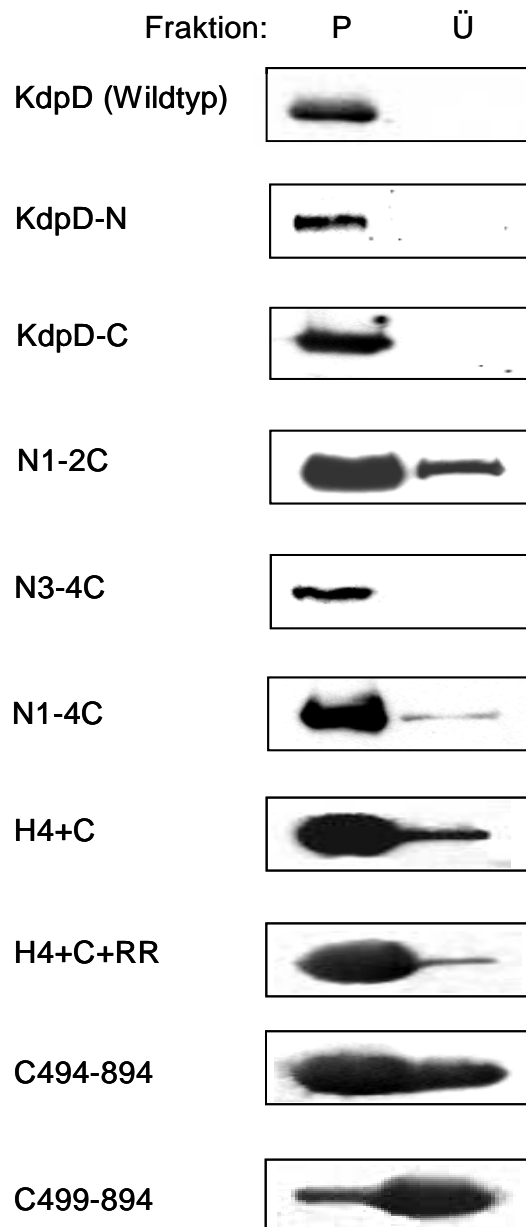


Abb. 36 Natriumcarbonat-Methode um die Membranlokalisierung der KdpD-Konstrukte zu untersuchen. Die Proteine aus dem Pellet (P) und dem Überstand (Ü) wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen. Mit Hilfe des Westernblots und KdpD-Antikörpers wurden die KdpD-Konstrukte nachgewiesen.

Die Konstrukte mit Transmembranregionen befinden sich hauptsächlich im Pellet. Bei dem Konstrukt N1-2C sind etwa 5% im Überstand lokalisiert. Die Proteine H4+C und H4+C+RR befinden sich hauptsächlich in der Pellet-Fraktion. C494-894 konnte sowohl im Pellet als auch in dem Überstand nachgewiesen werden. Das C499-894 Protein, das keine Transmembrane Region mehr hat, wurde hauptsächlich im Überstand nachgewiesen (s. Abb. 36).

3.6 β -Galaktosidase Nachweis bei unterschiedlichen

Ionenkonzentrationen

KdpD wird in der Literatur als Osmosensor beschrieben, der bei hohen Ionenkonzentrationen im Medium das KdpD-System aktiviert und somit zum Ausgleich des osmotischen Drucks in der Zelle beiträgt (Altendorf und Epstein, 1996; Liamins et al., 1981). Um diese osmotische Sensorfunktionen von KdpD weiter zu untersuchen, wurde der β -Galaktosidase Nachweis bei unterschiedlichen Ionen-Konzentrationen und osmotischen Bedingungen im Medium durchgeführt. Die KdpD-Konstrukte KdpD-C und C499-894 wurden auch auf ihre osmotischen Sensorfunktionen untersucht und mit dem KdpD Wildtyp verglichen.

3.6.1 Reaktion des abgeschalteten KdpD auf eine Erhöhung des osmotischen Drucks

Um die Auswirkung eines erhöhten osmotischen Drucks auf das ausgeschaltete KdpD (6 mM KCl) zu untersuchen, wurde dem Medium Sucrose, Glycerol und NaCl in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben.

Hierfür wurden die *E. coli* HAK006 Zellen mit dem transformierten KdpD Plasmid (pBD), in Minimalmedium mit einer K^+ -Konzentrationen von 6 mM und dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Mit dieser Übernachtskultur wurde frisches K6,0-Minimalmedium im Verhältnis 1:100 angeimpft. Eine Probe zu Zeit $t = 0$ wurde entnommen und die β -Galaktosidase Aktivität bestimmt. Nach der Zugabe von 0,2 bis 0,6 M Sucrose, Glycerol oder NaCl wurden die Zellen bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37°C wachsen gelassen.

Der Reaktionsansatz bestand aus 0,1 ml Zellen und 0,9 ml Z-Puffer (s. 2.2.7). Die Reaktion wurde nach 10 min gestoppt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und die β -Galaktosidase Aktivität nach der Miller-Formel berechnet (s. 2.3.10).

KdpD ist im K0,1-Medium aktiv mit ca. 3400 Miller Units. Durch Zugabe von Sucrose, Glycerol oder NaCl wurde der osmotische Druck im Medium bei gleichbleibender K^+ -Konzentration (6 mM) erhöht (s. Abb. 37). Die Sensorkinase KdpD zeigt, wenn man sich an der Aktivität im K0,1-Minimalmedium orientiert, kaum eine Reaktion. Auf die Zugabe von Sucrose und Glycerol reagierte das System nicht und blieb inaktiv. Nach der Zugabe von 0,4 und 0,6 M NaCl konnte ein leichter Anstieg der Aktivität auf ca. 100 Units beobachtet werden.

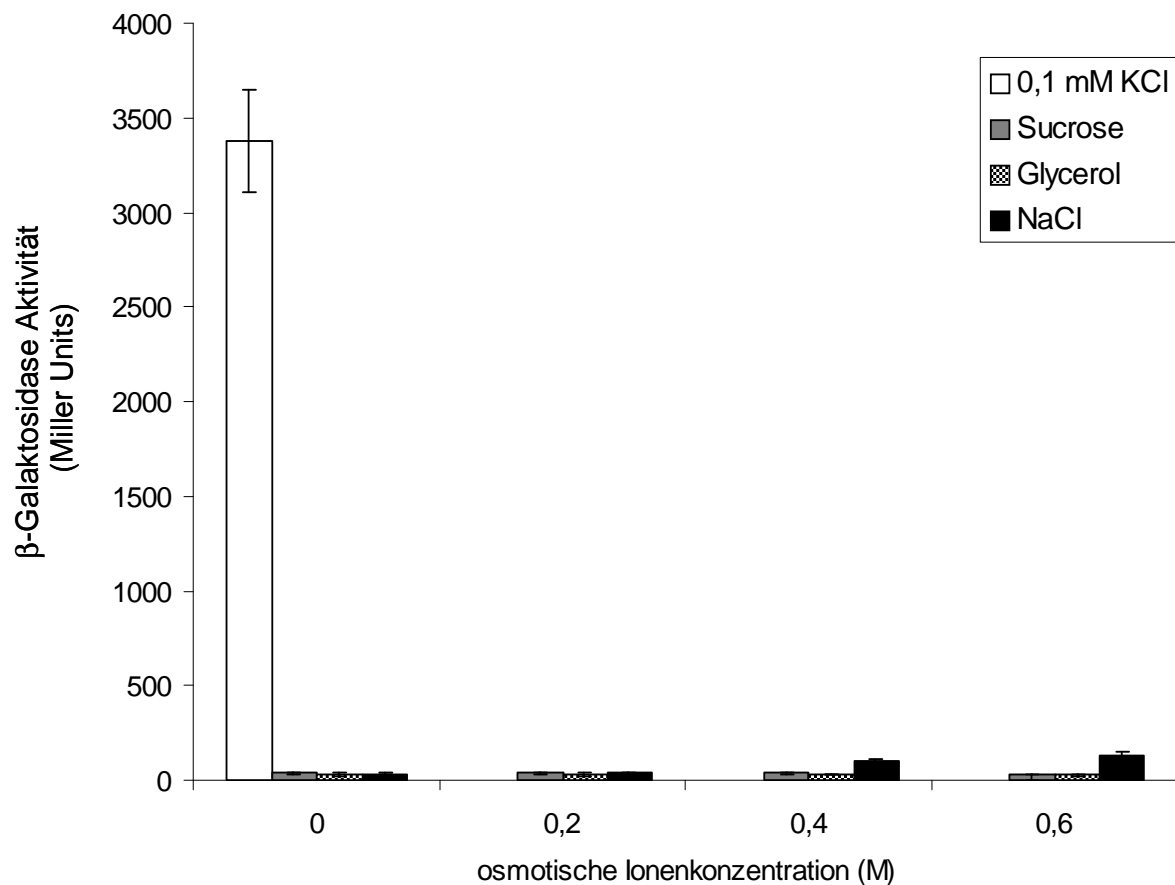


Abb. 37 β -Galaktosidase Aktivität von KdpD bei erhöhtem osmotischen Druck. Es wurden 0,2 bis 0,6 M Sucrose (grauer Balken), Glycerol (kariertes Balken) und NaCl (schwarzer Balken) dem K6,0-Minimalmedium zugegeben. Als Vergleichskontrolle diente die β -Galaktosidase Aktivität von KdpD im K0,1-Minimalmedium zur Zeit $t = 0$ (weißer Balken).

3.6.2 KdpD bei erhöhter Ionenkonzentration im Medium in Abhängigkeit zur KCl-Konzentration

Bei diesem Versuch sollte untersucht werden, ob KdpD bei erhöhtem osmotischen Druck noch auf die Änderung der K⁺-Konzentration im Minimalmedium reagiert. Auch sollte die Reaktion auf die Zugabe von LiCl untersucht werden.

Hierfür wurden die *E. coli* HAK006 Zellen mit dem transformierten KdpD-Plasmid (pBD) in Minimalmedium mit unterschiedlichen K⁺-Konzentrationen (0,1 mM; 6 mM) und dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurde frisches Minimalmedium mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen (0,1 bis 100 mM) angeimpft. Zu dem K0,1- und K6,0-Minimalmedium wurde zusätzlich noch 100 mM NaCl oder LiCl gegeben.

Der Reaktionsansatz bestand aus 0,1 ml Zellen und 0,9 ml Z-Puffer (s. 2.2.7). Die Reaktion wurde nach 10 min gestoppt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und die β-Galaktosidase Aktivität nach der Miller-Formel berechnet (s. 2.3.10). Die β-Galaktosidase Aktivität von KdpD bei 0,1 mM KCl im Minimalmedium wurde als 100% gesetzt und die anderen Werte danach berechnet.

KCl (mM)	zugegebenes Salz (100mM)	Aktivität (Miller Units in %)
0,1	-	100
6,0	-	1,4
100	-	0,6
0,1	NaCl	112
6,0	NaCl	0,7
0,1	LiCl	150
6,0	LiCl	0,8

Tab. 10 Die β-Galaktosidase Aktivität des KdpD Wildtyps in hochmolarem Medium mit verschiedenen Salz-Konzentrationen.

Der KdpD Wildtyp reagiert auf eine Erhöhung der K⁺-Konzentration im Medium und schaltet seine Aktivität wie schon beobachtet ab. Auch bei einer sehr hohen K⁺-

Konzentration (100 mM), die sich auch osmotisch auf das System auswirkt, ist das System inaktiv (s. Tab. 10). Auch bei der Zugabe von 100 mM NaCl oder LiCl ist KdpD aktiv bei einer niedrigen K^+ -Konzentration (0,1 mM) und schaltet bei einer Erhöhung (6,0 mM) ab.

Durch die LiCl Zugabe (100 mM) ist eine erhöhte Aktivität im K0,1-Minimalmedium zu beobachten (150% im Vergleich zum Wildtyp KdpD bei 100%) (s. Tab. 10).

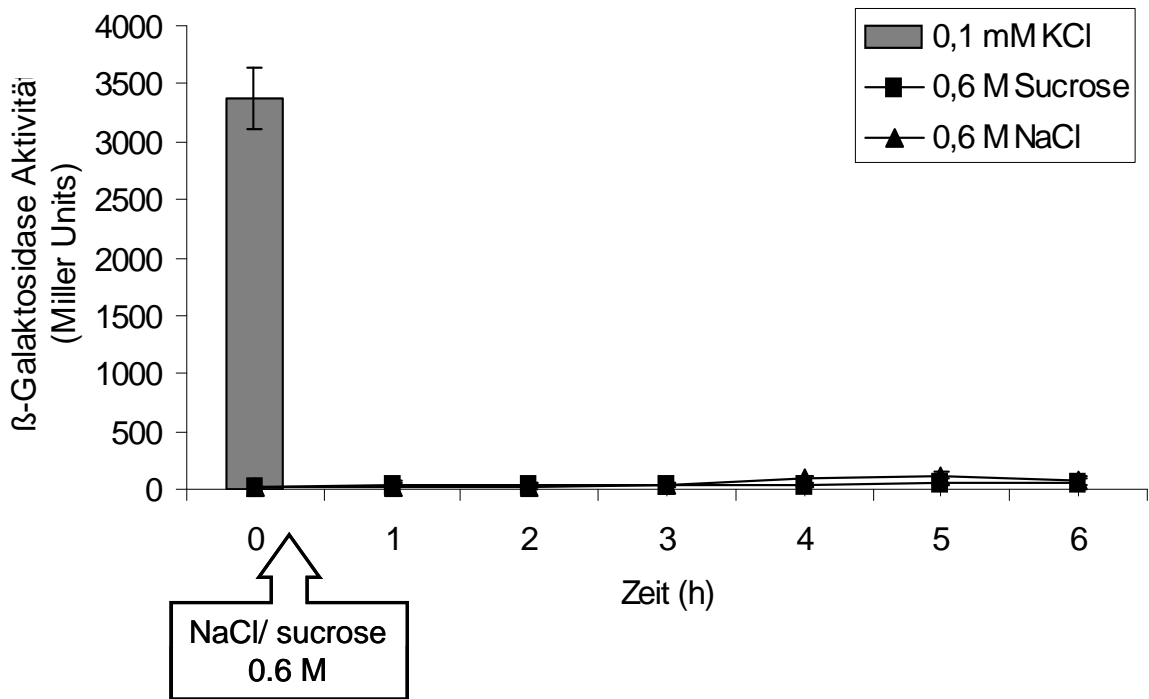
3.6.3 Vergleich der Aktivierung von KdpD Wildtyp und KdpD-C bei erhöhter Ionenkonzentration zur K^+ -Limitierung

Für diesen Versuch wurden die Plasmide für KdpD und KdpD-C in *E. coli* HAK006 Zellen (s. 2.2.8.5) transformiert. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit unterschiedlichen K^+ -Konzentrationen (0,1 mM; 6 mM) über Nacht bei 37°C angezüchtet. Mit dieser Übernachtskultur wurde frisches Minimalmedium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 wachsen gelassen. Bei den Kulturen im K0,1-Minimalmedium wurde dann gleich die β -Galaktosidase Aktivität bestimmt (s. 2.3.10). Zu den Kulturen im K6,0-Minimalmedium wurde 0,6 M Sucrose oder NaCl zugegeben. Jede Stunde wurde eine Probe entnommen und die β -Galaktosidase Aktivität bestimmt.

Der Reaktionsansatz bestand aus 0,1 ml Zellen (*E. coli* HAK 006) und 0,9 ml Z-Puffer (s. 2.2.7). Die Reaktion wurde nach 10 min gestoppt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und die β -Galaktosidase Aktivität nach der Miller-Formel berechnet (s. 2.3.10).

Bei dem Vergleich der β -Galaktosidase Aktivität, die bei einer K^+ -Limitierung entsteht und der Aktivierung, die durch eine Erhöhung der Ionenkonzentration im Medium entsteht, ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen (s. Abb. 38). Bei KdpD ist nach 3 bis 4 Stunden der NaCl-Zugabe ein leichter Anstieg der Aktivität auf ca. 100 Miller Units zu erkennen. Nach Zugabe der Sucrose ist keine Änderung der Aktivität erkennbar (s. Abb. 38a). KdpD-C zeigte, wie KdpD auch, im Vergleich zu einer K^+ -Limitierung keine Reaktion auf die Zugabe von Sucrose im Medium. auch auf die Zugabe von NaCl reagierte KdpD-C nicht mit einer Änderung der β -Galaktosidase Aktivität (s. Abb. 38b).

a) KdpD



b) KdpD-C

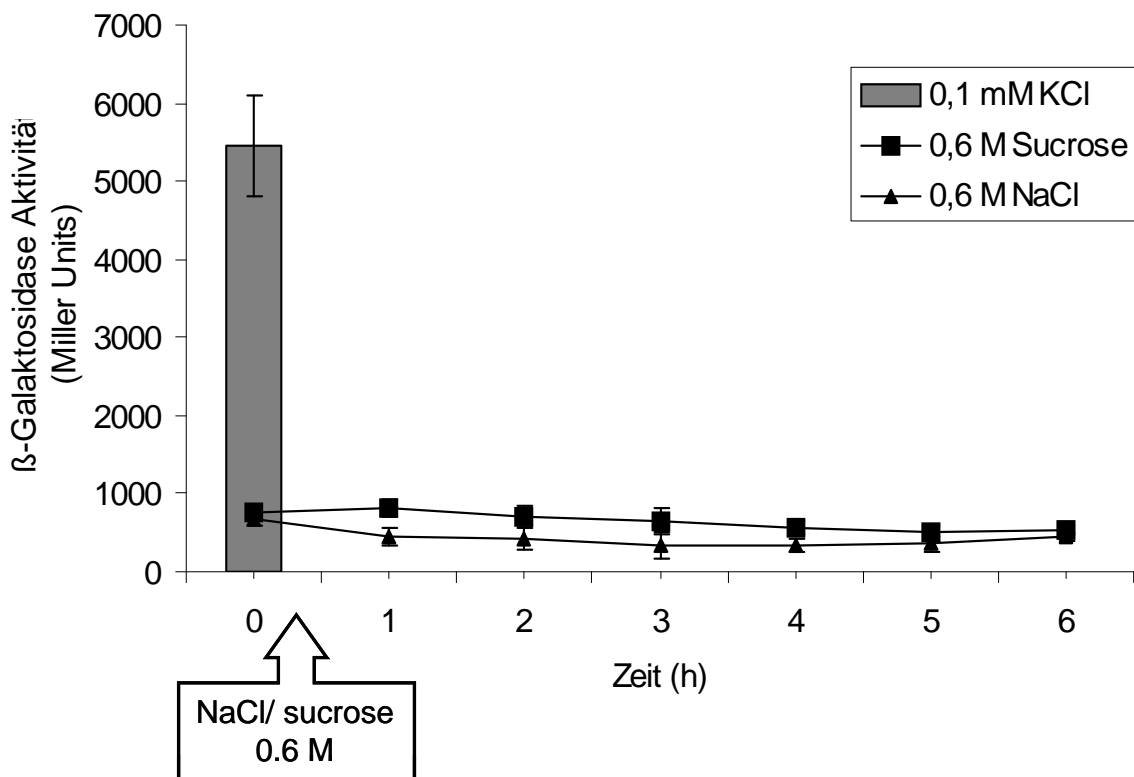


Abb. 38 β -Galaktosidase Nachweis von KdpD (a) und KdpD-C (b) in K0,1- (grauer Balken) und K6,0-Minimalmedium mit 0,6 M NaCl (\blacktriangle) oder 0,6 M Sucrose (\blacksquare). Nach Zugabe von NaCl oder Sucrose wurde alle 60 min eine Probe entnommen und die β -Galaktosidase Aktivität bestimmt.

3.6.4 Aktivierung des KdpD Wildtyp im Vergleich zu KdpD-C und C499-894

Bei diesem Versuch wurde die Aktivierung von KdpD und auch die Reaktion auf die Zugabe von RbCl und LiCl untersucht. Ebenso wurde die Reaktion von KdpD-C und C499-894 auf die Zugabe von RbCl oder LiCl untersucht und mit dem KdpD Wildtyp verglichen.

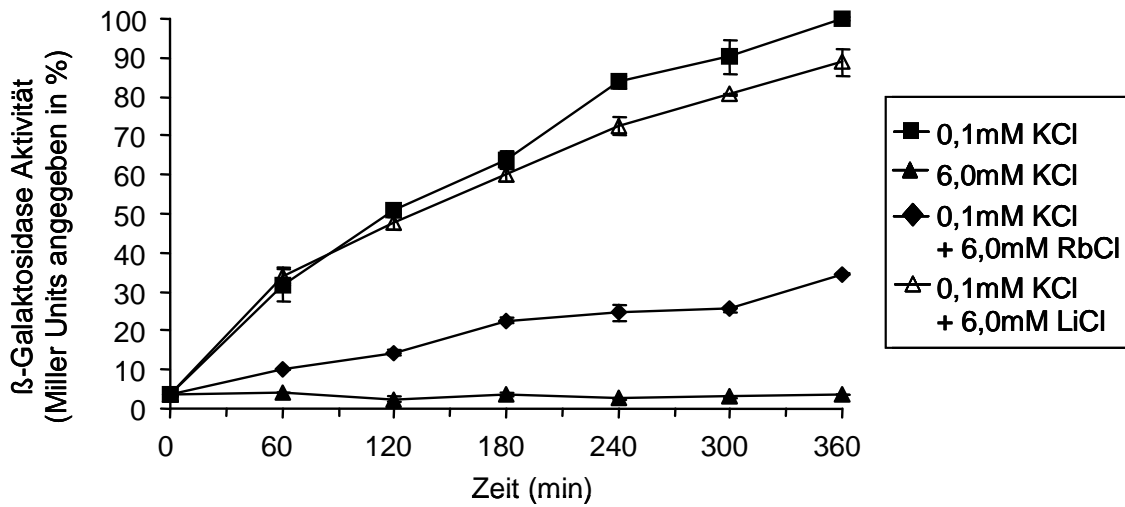
Hierfür wurden die Plasmide KdpD, KdpD-C und C499-894 (Tab. 8, S. 69) in den *E. coli* Stamm HAK006 (s. 2.2.8.5) transformiert. Die *E. coli* HAK006 Zellen mit den entsprechenden Plasmiden, wurden in K6,0-Minimalmedium (s. 2.2.6) mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C angezüchtet. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit K0,1-Minimalmedium gewaschen. Mit diesem Ansatz wurde frisches K0,1-Minimalmedium mit verschiedenen Ionen-Konzentrationen (s. Abb. 39) angeimpft. Zum Zeitpunkt 0 min wurde die β -Galaktosidase Aktivität im inaktiven Zustand bestimmt (s. 2.3.10) und dann 6,0 mM RbCl oder LiCl dem Medium zugegeben. Alle 60 min wurde eine weitere Probe entnommen. Als inaktive Kontrolle diente eine Probe in K6,0-Minimalmedium.

Der Reaktionsansatz bestand aus 0,1 ml Zellen (*E. coli* HAK 006) und 0,9 ml Z-Puffer (s. 2.2.7). Die Reaktion wurde nach 10 min gestoppt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und die β -Galaktosidase Aktivität nach der Miller-Formel berechnet (s. 2.3.10). Die β -Galaktosidase Aktivität von KdpD bei 0,1 mM KCl im Minimalmedium wurde als 100% gesetzt und die anderen Werte danach berechnet.

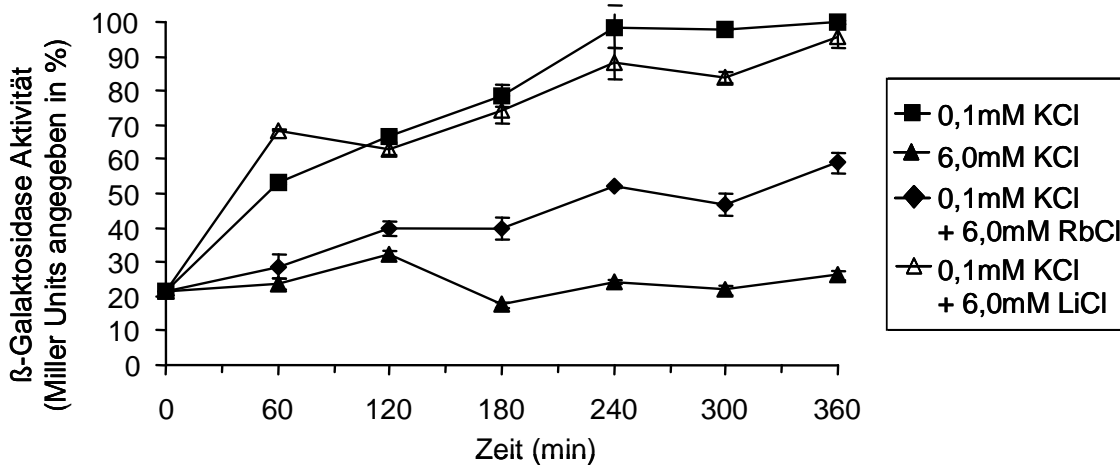
Die HAK006 Zellen mit dem KdpD Wildtyp (Abb. 39a) zeigten einen schnellen Anstieg der β -Galaktosidase Aktivität im K0,1-Minimalmedium. Auch nach Zugabe von 6 mM LiCl war der Wildtyp voll aktiviert. Dagegen war nach Zugabe von 6 mM RbCl ein reduziertes Level der Aktivierung (ca. 35%), im Vergleich zum K0,1-Minimalmedium (100%), zu sehen.

Die HAK006 Zellen mit den transformierten KdpD-C (Abb. 39b) und C499-894 (Abb. 39c) Plasmiden zeigten zur Zeit 0 min eine relativ hohe basale Aktivität (ca. 20%). Die Reaktion auf die K^+ -Limitierung (0,1 mM KCl) war, wie beim KdpD, ein schneller Anstieg der Aktivität. Bei 6 mM RbCl in Medium zeigten beide KdpD-Konstrukte eine reduzierte Aktivität, dagegen waren sie nach Zugabe von 6 mM LiCl voll aktiv.

a) KdpD



b) KdpD-C



c) C499-894

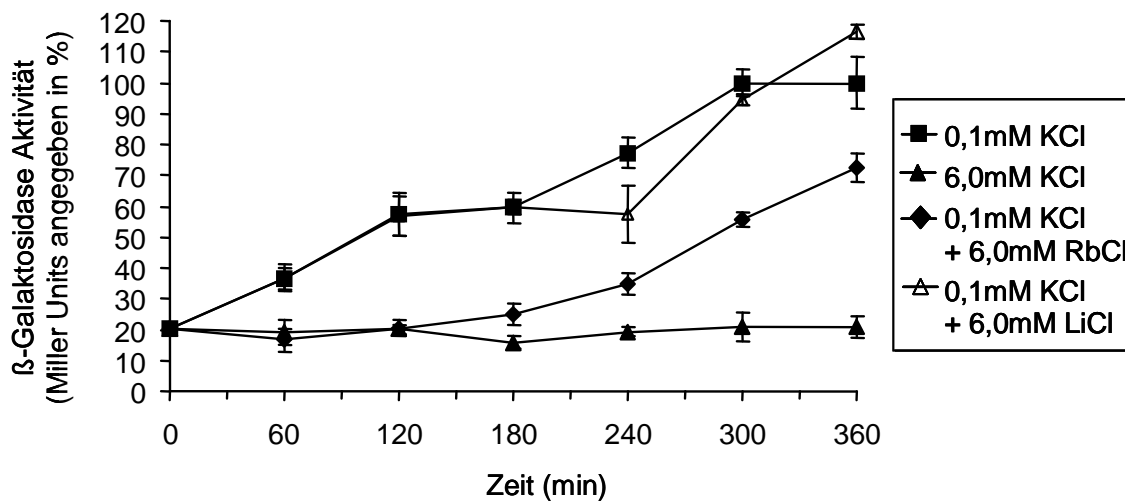


Abb. 39 β -Galaktosidase Nachweis in K0,1- (■) und K6,0-Minimalmedium (▲) und nach Zugabe von 6,0 mM RbCl (◆) oder 6mM LiCl (△). Alle 60 min wurde eine Probe entnommen und die β -Galaktosidase Aktivität von KdpD, KdpD-C und C499-894 überprüft.

3.6.5 Inaktivierung des KdpD Wildtyp im Vergleich zu KdpD-C und C499-894

Um zu bestätigen, dass KdpD-C und das C499-894 Protein funktionsfähige K^+ -Sensoren sind, die Reaktionen vergleichbar dem KdpD Wildtyp zeigen, wurde die Inaktivierung dieser Konstrukte untersucht. Die mit den entsprechenden Plasmiden transformierten *E. coli* HAK006 Zellen wurden in K0,1-Minimalmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C angezüchtet. Mit dieser Übernachtskultur wurde frisches K0,1-Minimalmedium angeimpft. Zum Zeitpunkt 0 min wurde die β -Galaktosidase Aktivität im aktiven Zustand bestimmt (s. 2.3.10) und dann 6,0 mM KCl dem Medium zugegeben. Alle 60 min wurde eine weitere Probe entnommen (Abb. 40a) und die β -Galaktosidase Aktivität bestimmt.

Um die kritische Konzentration, bei der das Kdp-System abschaltet zu bestimmen, wurden die HAK006 Zellen mit den transformierten Plasmiden auch über Nacht in K0,1-Minimalmedium angezüchtet und dann in frisches Medium mit verschiedenen K^+ -Konzentrationen überführt. Die Zellen wurden 5 h bei 37°C inkubiert und die β -Galaktosidase Aktivität gemessen (Abb. 40b).

Der Reaktionsansatz bestand aus 0,1 ml Zellen (*E. coli* HAK 006) und 0,9 ml Z-Puffer (s. 2.2.7). Die Reaktion wurde nach 10 min gestoppt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und die β -Galaktosidase Aktivität nach der Miller-Formel berechnet (s. 2.3.10). Die β -Galaktosidase Aktivität von KdpD bei 0,1 mM KCl im Minimalmedium wurde als 100% gesetzt und die anderen Werte danach berechnet.

Die β -Galaktosidase Aktivität reduziert sich langsam über einen Zeitraum von 5 Stunden bei allen drei KdpD-Proteinen (s. Abb. 40a). KdpD hatte nach ca. 360 min eine Restaktivität von 10%, KdpD-C eine von ca. 30% und C499-894 von ca. 40%.

Bei allen drei KdpD-Konstrukten reduzierte sich die β -Galaktosidase Aktivität mit der Erhöhung der K^+ -Konzentration (s. Abb. 40). Bei dem Wildtyp KdpD ist eine K^+ -Konzentration von 3 mM ausreichend um das System zu inaktivieren (s. Abb. 40b). Auch hier zeigten KdpD-C und C499-894 eine erhöhte Restaktivität im Vergleich zum Wildtyp KdpD.

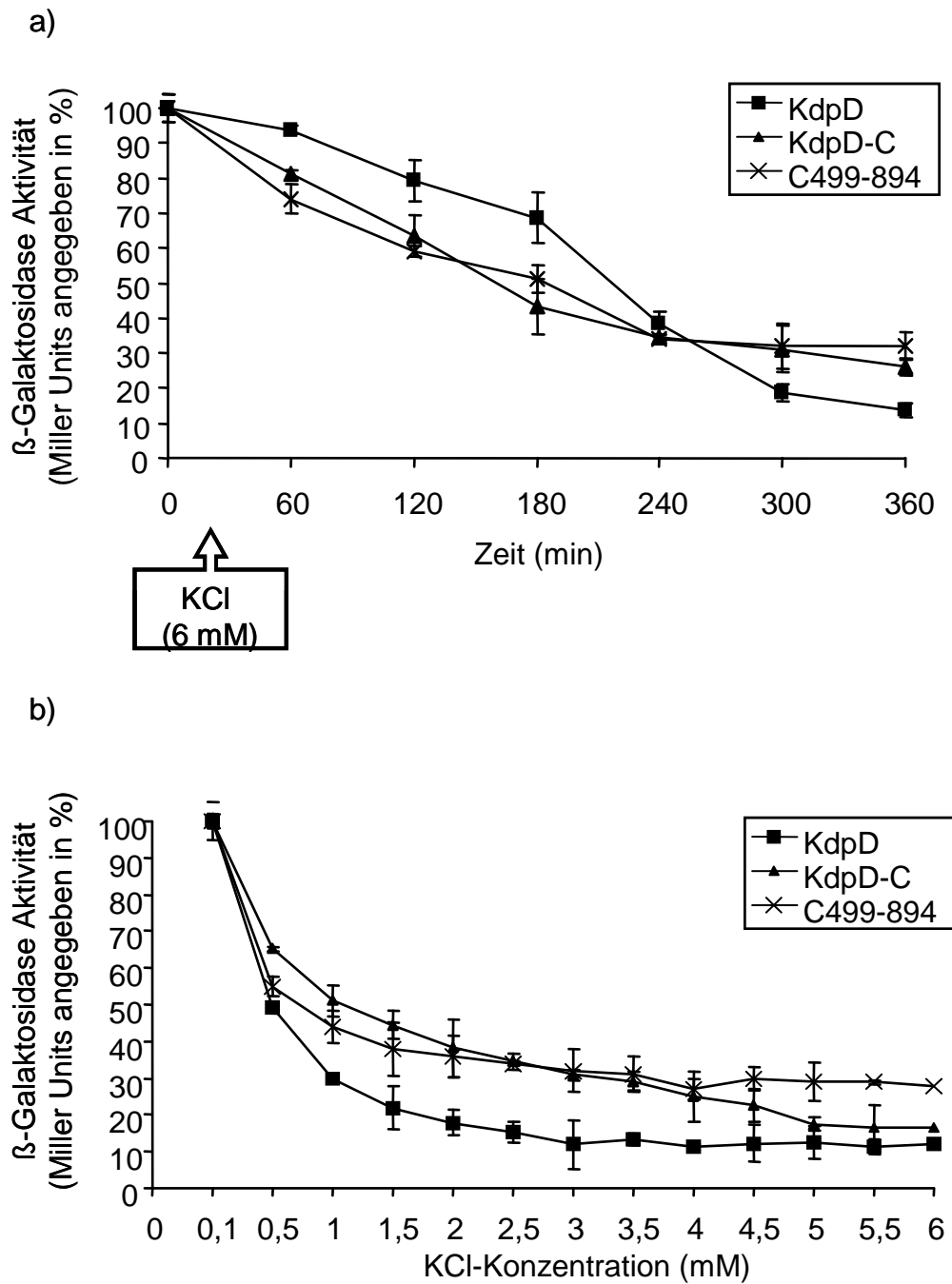


Abb. 40 β -Galaktosidase Nachweis für KdpD (■), KdpD-C (▲) und C499-894 (X) in K0,1-Minimalmedium nach Zugabe von 6,0 mM KCl (a) oder verschiedenen KCl-Konzentrationen (0,1-6 mM) (b). Alle 60 min (a) wurde eine Probe entnommen und die β -Galaktosidase Aktivität überprüft.

3.7 Reinigung von KdpD-C

Um mehr über die Funktion von KdpD-C zu erfahren wurde ein N-terminales His-Tag fusioniert. Nach einer Überexpression wurde das Protein über eine NiNTA-Säule gereinigt.

3.7.1 Expression von KdpD-C in *E. coli* M15 (pREP4)

Für die Proteinexpression von KdpD-C wurde das Plasmid pMR24 (s. 3.1, Tab. 8) in den *E. coli* Stamm M15 (pREP4) (s. 2.2.8.3) transformiert. Dies erlaubte eine gezielte Überexpression über das T5-System. Eine N-terminal an KdpD-C fusionierte Hexahistidinsequenz (KdpD-C-His₆) ermöglichte eine Reinigung über eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (2.3.15).

Die Zellen wurden in LB-Medium (s. 2.2.6) mit 1% Glucose und den entsprechenden Antibiotika (Amp und Kan) bei 37°C angezchtet. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 wurde mit 1 mM IPTG induziert (s. 2.3.14.3). Die Zellen wurde über Nacht bei 10°C wachsen gelassen. Durch das Zusatzplasmid pREP4 und die niedrige Temperatur wurde eine zu starke Überexpression des Proteins verhindert, da sich dies toxisch auf die Zelle auswirkte. Die durch Zentrifugation erhaltenen Zellen wurden in Tris/Sucrose (25% Sucrose in 20 mM Tris/HCl pH 7,5) resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.7.2 Solubilisierung

Da KdpD-C ein Membranprotein ist, mussten die Zellen solubilisiert werden. Die resuspendierten Zellen wurden mit Hilfe der French Press aufgeschlossen (s. 2.3.14.1). Durch Zugabe von 1,5% Sarcosyl wurde KdpD-C-His₆ aus der Membran gelöst. Nach dem folgenden Ultrazentrifugationsschritt befand sich das Membranprotein im Überstand (s. 2.3.14.1). Das Pellet wurde in 1x PBS resuspendiert.

3.7.3 Proteinreinigung

Die Reinigung des, mit einem N-terminalen His-Tag fusionierten, KdpD-C-Proteins (KdpD-C-His₆) erfolgte durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) über eine Ni-NTA-Säule (2.3.15.1).

Die solubilisierete Proteinfraction (S_S) wurde mit 10 mM Imidazol versetzt. Nach Zugabe der gewaschenen Ni-NTA-Agarose inkubierte der Ansatz 1 h unter Rotation bei 10°C. Anschließend wurde die Säule gepackt, der Durchfluss (FT) aufgefangen und bei 4°C aufbewahrt. Die Säule wurde dann zweimal mit Puffern mit niedriger Imidazolkonzentration gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm gegen Null ging.

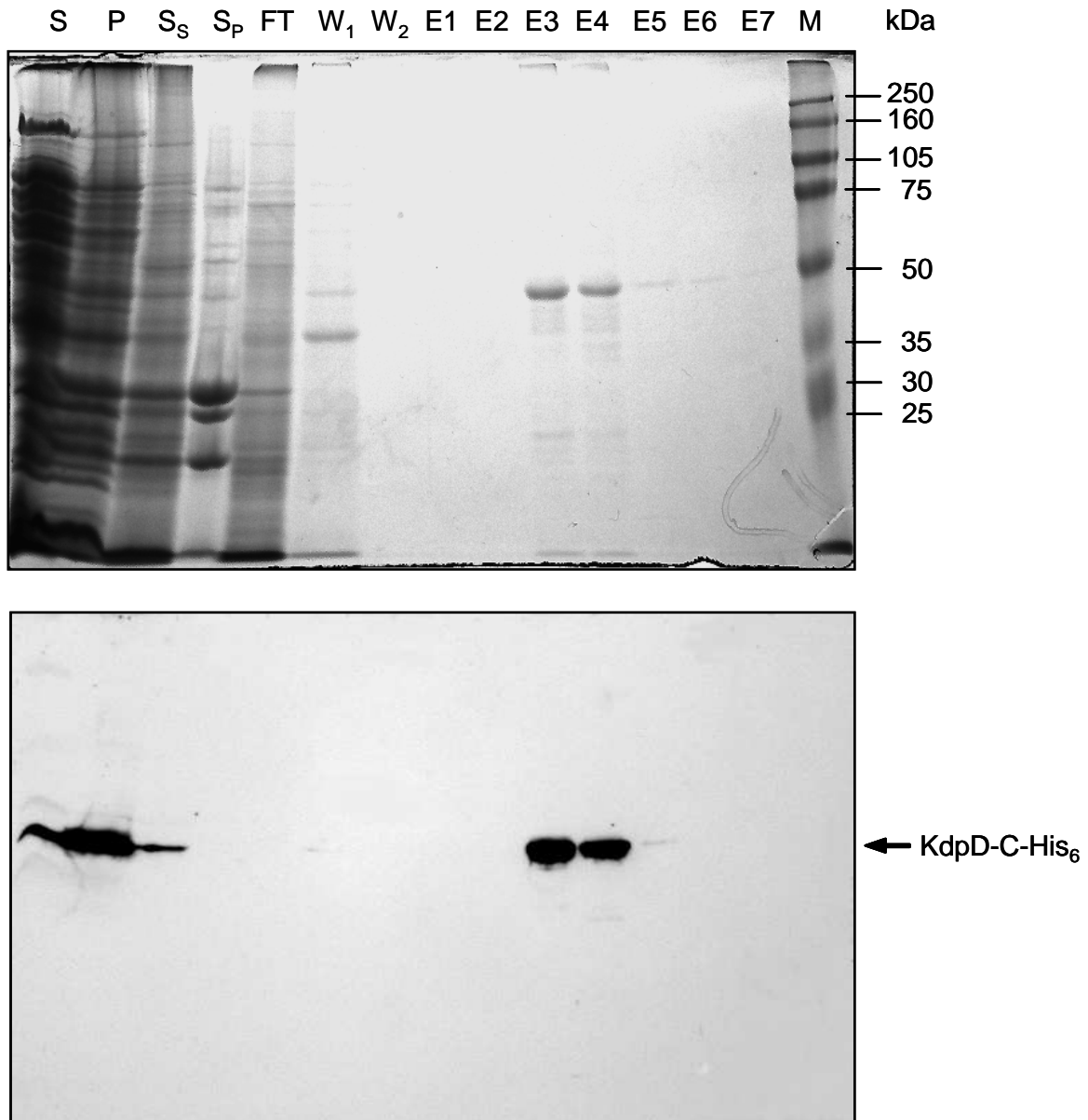


Abb. 41 SDS-Page (12,5%) Analyse Comassie gefärbt (oben) und Westernblot (unten) der einzelnen Schritte der Reinigung des KdpD-C-His₆ Proteins durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) über eine Ni-NTA-Säule. Das Protein wurde mit Hilfe des His-Antikörpers nachgewiesen. S = Überstand, P = Pellet, S_S = Solubilisierung Überstand, S_P = Solubilisierung Pellet, FT = Durchlauf, W_1 = Waschschrift 1, W_2 = Waschschrift 2, E1 bis E7 = Eluationsschritt 1 bis 7, M = Marker

Gleichzeitig erfolgte der Austausch des ionischen Detergenz Sarcosyl (2%) gegen das nichtionische Dodecylmaltosid (0,2 mg/ml). Daraufhin wurde das, an die Ni-NTA gebundene, KdpD-C mit dem zehnfachen Säulenvolumen an Elutionspuffer (100 mM Imidazol) eluiert. Die Ergebnisse der Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE (s. 2.3.12), das Comassie gefärbt wurde, dokumentiert. Durch einen Westernblot (s. 2.3.13) mit dem His-Antikörpers konnte das KdpD-C-His₆ Proteine nachgewiesen werden (s. Abb. 41).

Das Protein KdpD-C-His₆ wurde fast vollständig im Eluationsschritt 3 und 4 von der Ni-NTA-Säule gelöst. Die Fraktionen weisen leichte Verunreinigungen auf (s. Abb. 41). Diese coeluierten Banden tauchten immer wieder bei der Reinigung von KdpD-C auf. Die Eluationsfraktionen 3 und 4 wurden mittels Ultrafiltration (Centricon) bis zu einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml eingeeengt und bei 4°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Bradford-Methode angewandt (s. 2.3.16.3). Aus einer 1 l Bakterienkultur konnte ca. 0,5 mg KdpD-C-His₆ gereinigt werden.

Das gereinigte KdpD-C-His₆ erwies sich als relativ instabil. Schon nach kurzer Zeit fand der protolytische Abbau statt (s. Abb. 42), so dass die weiterführenden Versuche am gleichen oder spätestens darauffolgenden Tag angesetzt waren.

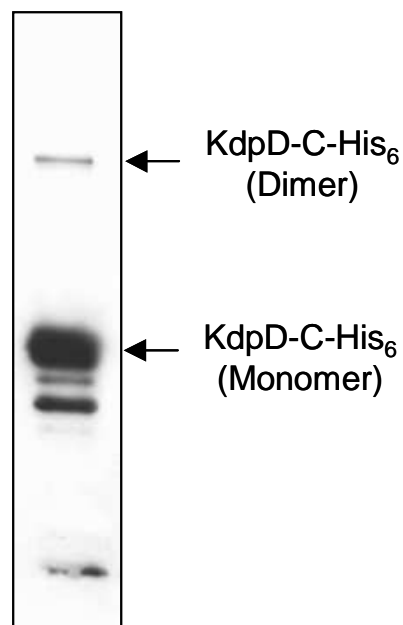


Abb. 42 Nachweis einer Dimerbildung des gereinigten KdpD-C-His₆ mit Hilfe des Westernblots mit His-Antikörper. Ebenso sieht man die Abbauprodukte des KdpD-C-His₆ Proteins bei zu langer Lagerung.

In der angereicherten Elutionsfraktion konnte, obwohl die Proben gekocht wurden und DTT zugegeben wurde, mit Hilfe der SDS-Page (12,5%) und einem Immunonachweis mit einem His-Antikörper eine Dimerbildung von KdpD-C-His₆ (ca. bei 100 kDa) nachgewiesen werden (s. Abb. 42).

Auf dem Westernblot (s. Abb. 42) konnte man auch die Abbauprodukte, die noch den His-Rest enthielten, unterhalb des KdpD-C-His₆ Monomers sehen. Diese konnten bei zu langer Lagerung (bei 4°C) des gereinigten Proteins entstehen.

3.8 Reinigung von KdpD

So wie das KdpD-C Protein wurde auch KdpD mit einem N-terminalen His-Tag fusioniert, jedoch mit einem 10x His-Tag des pET16b Vektors. Nach der Überexpression und Solubilisierung, wurde KdpD über eine NiNTA-Säule gereinigt.

3.8.1 Expression von KdpD in *E. coli* C41(DE3)

Für die Überexpression von KdpD wurde das pFK1 Plasmid (s. Tab. 8, S. 69) in den *E. coli* Stamm C41(DE3), der das Gen für die T7-RNA-Polymerase besitzt (s. 2.2.8.2), transformiert. Mit Hilfe der fusionierten N-terminalen 10x Histidinsequenz konnte KdpD-His₁₀ über eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (s. 2.3.16.2) gereinigt werden.

Die Zellen wurden in LB-Medium (s. 2.2.6) mit 1% Glucose und dem entsprechenden Antibiotika (Amp) bei 37°C angezüchtet. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 wurde mit 1 mM IPTG induziert (s. 2.3.14.4) und über Nacht bei 10°C inkubiert. Die durch Zentrifugation erhaltenen Zellen wurden in Tris/Sucrose (25% Sucrose in 20 mM Tris/HCl pH 7,5) resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.8.2 Solubilisierung

Um das Membranprotein KdpD-His₁₀ reinigen zu können, wurden die Zellen mit einem Detergenz solubilisiert. Hierfür wurden die resuspendierten Zellen mit Hilfe der French Press aufgeschlossen. Durch Zugabe von 2% Sarcosyl konnte KdpD-His₁₀ dann aus der Membran gelöst werden. Nach dem folgenden Ultrazentrifugationsschritt befand sich KdpD-His₁₀ im Überstand (s. 2.3.15.2).

3.8.3 Proteinreinigung

Die Reinigung des, mit einem N-terminalen His-Tag fusionierten, KdpD-Proteins (KdpD-His₁₀) erfolgte mit Hilfe der immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) über eine Ni-NTA-Säule (s. 2.3.15.2).

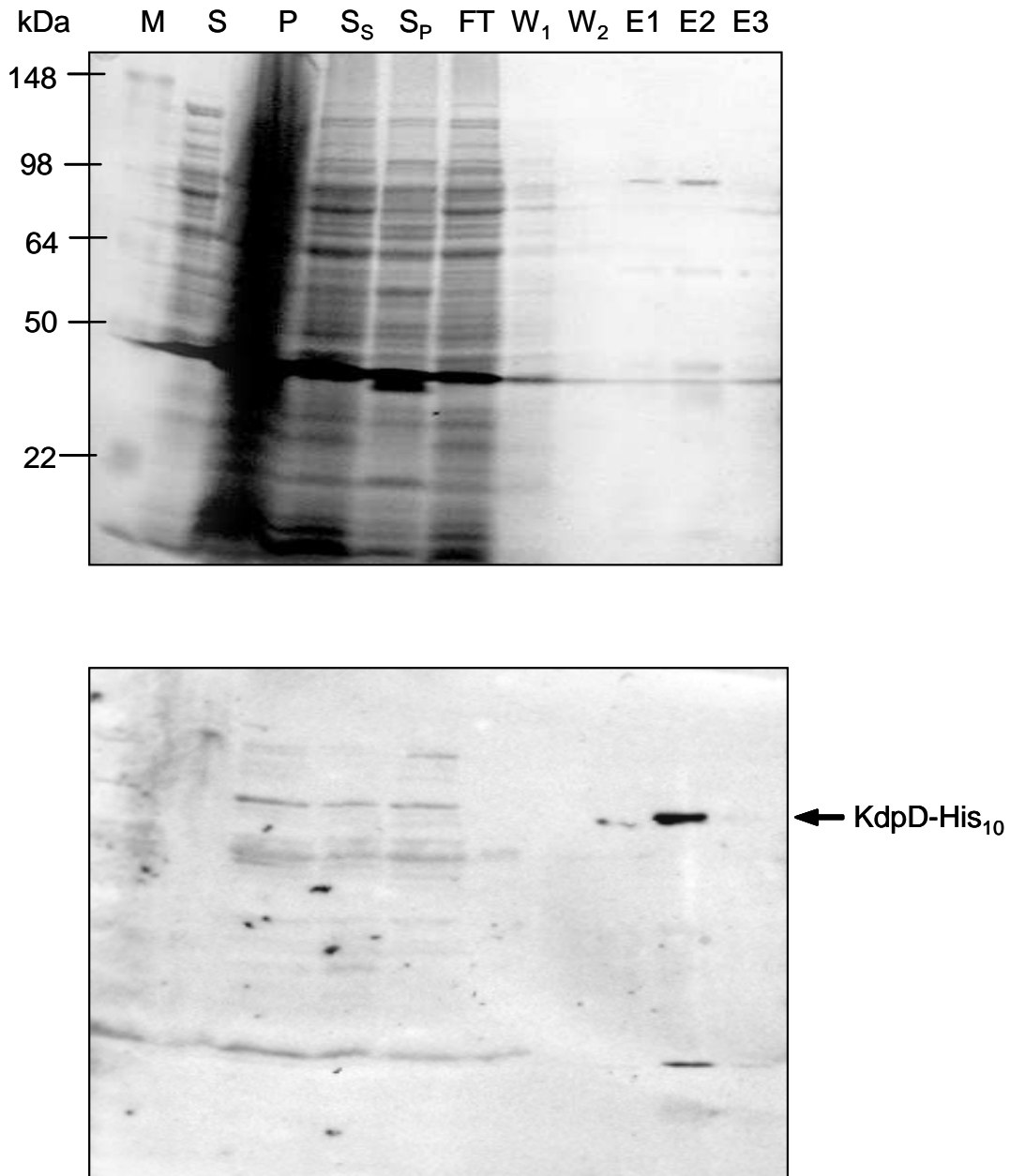


Abb. 43 SDS-Page (12,5%) Analyse Comassie gefärbt (oben) und Westernblot (unten) der einzelnen Schritte der Reinigung des KdpD-His₁₀ Proteins durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) über eine Ni-NTA-Säule. Das Protein wurde mit Hilfe des His-Antikörpers nachgewiesen. S = Überstand, P = Pellet, S_s = Solubilisierung Überstand, S_p = Solubilisierung Pellet, FT = Durchlauf, W₁ = Waschschrift 1, W₂ = Waschschrift 2, E1 bis E3 = Eluationsschritt 1 bis 3, M = Marker.

Die solubilisierte Proteinfraction (S_5) wurde mit 10 mM Imidazol versetzt. Nach Zugabe der gewaschenen Ni-NTA-Agarose inkubierte der Ansatz 1 h unter Rotation bei 10°C. Damit wurde anschließend die Säule gepackt, der Durchfluss aufgefangen und bei 4°C aufbewahrt. Um die ungebundenen Proteine und die Verschmutzungen zu entfernen wurde die Säule zweimal mit Puffern mit niedriger Imidazolkonzentration gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm gegen Null ging. Gleichzeitig erfolgte der Austausch des ionischen Detergenz Sarcosyl gegen das nichtionische Dodecyl- β -maltosid. Das, an die Ni-NTA gebundene, KdpD-His₁₀ wurde mit dem zehnfachen Säulenvolumen an Elutionspuffer (100 mM Imidazol) eluiert.

Die Ergebnisse der Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE (s. 2.3.12) und Westernblot (s. 2.3.13) dokumentiert (s. Abb. 43).

Das Protein KdpD-His₁₀ wurde im Eluationsschritt 1 und 2 von der Ni-NTA-Säule gelöst. Die Fraktionen weisen leichte Verunreinigungen auf. Wie auch bei der Reinigung von KdpD-C, tauchen auch hier immer wieder bei der Reinigung von KdpD coeluierte Banden auf. Die Eluationsfraktionen 1 und 2 wurden mittels Ultrafiltration (Centricon) bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 0,8 mg/ml eingeeengt und bei 4°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Bradford-Methode angewandt (s. 2.3.16.3). Aus einer 1 l Bakterienkultur konnte ca. 0,8 mg KdpD-His₁₀ gereinigt werden.

Das gereinigte KdpD-His₁₀ erwies sich, ebenso wie KdpD-C-His₆, als relativ instabil. Auch hier fand schon nach kurzer Zeit der protolytische Abbau statt, so dass die weiterführenden Versuche am gleichen oder spätestens darauffolgenden Tag angesetzt wurden.

3.9 Vergleich der coeluierten Proteinbanden

Da bei der Reinigung von KdpD und KdpD-C immer wieder einige Verunreinigungen auftraten, sollten diese coeluierte Proteinbanden genauer untersucht werden. Eventuell könnte es sich um Proteine handeln, die mit KdpD in irgendeiner Form interagieren. Um mehr über diese coeluierten Proteine zu erfahren, wurden die Reinigungsfraktionen von KdpD und KdpD-C (s. 3.7 und 3.8) auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Interessant waren nur die Proteinbanden, die in beiden Reinigungen vorkamen und bei dem Westernblot (s. 2.3.13) keine Reaktion auf den His-Antikörper (s. 2.2.5)

zeigten. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Abbauprodukte von KdpD oder KdpD-C handelte.

Bei dem Vergleich des SDS-Gels und des Westernblots der Reinigungen wurden 2 interessante Banden entdeckt. Die eine Proteinbande bei ca. 66 kDa und die andere bei ca. 30 kDa (s. Abb. 44). Diese Proteine wurden in der Reinigung von KdpD und KdpD-C nachgewiesen. Durch den His-Antikörper Nachweis und den Westernblot konnten die KdpD und KdpD-C Abbauprodukte ausgeschlossen werden, die noch die His-Sequenz trugen.

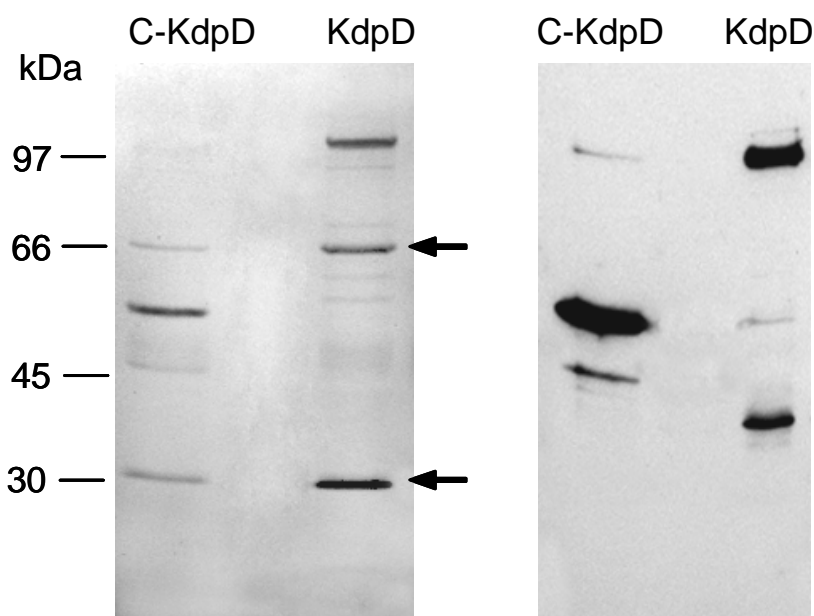


Abb. 44 12,5% SDS-Gel Comassie gefärbt (links) und Westernblot (rechts) der Reinigungsfraktionen von KdpD und KdpD-C. Die coeluierten Proteinbanden (bei 66 kDa und 30 kDa), die nicht auf dem Westernblot zu sehen sind, sind mit Pfeilen markiert.

3.10 Vergleich der Reinigung von KdpD und KdpD-C mit einer Kontrolle (*E. coli* HJM)

Um diese coeluierten Banden bei 30 und 66 kDa genauer zu untersuchen, wurden die Reinigungsfraktionen von KdpD und KdpD-C mit denen eines Kontrollstamms (*E. coli* HJM) verglichen.

Für diesen Vergleich wurden die Proteine KdpD-His₁₀ und KdpD-C-His₆ aus LB-Medium (s. 3.7 und 3.8) und aus K0,1-Minimalmedium gereinigt. Die Reinigung aus

dem K0,1-Minimalmedium wurde unter den gleichen Bedingungen wie in LB-Medium durchgeführt (s. 2.3.14, 2.3.15, 2.3.16). Als Kontrolle wurde der *E. coli* Stamm HJM ohne PLasmid) (s. 2.2.8.7) unter den gleichen Bedingungen „gereinigt“.

Bei diesem Versuch sollten auch untersucht werden, ob die Reinigung aus unterschiedlichen Medien einen Einfluss auf das Ergebnis hat, da KdpD und KdpD-C im K0,1-Minimalmedium aktiv sind (s. 3.4). Ebenso sollte untersucht werden, ob die coeluierten Proteine (s. 3.9 und 3.10), auch in den entsprechenden Fraktionen von *E. coli* HJM auftauchen.

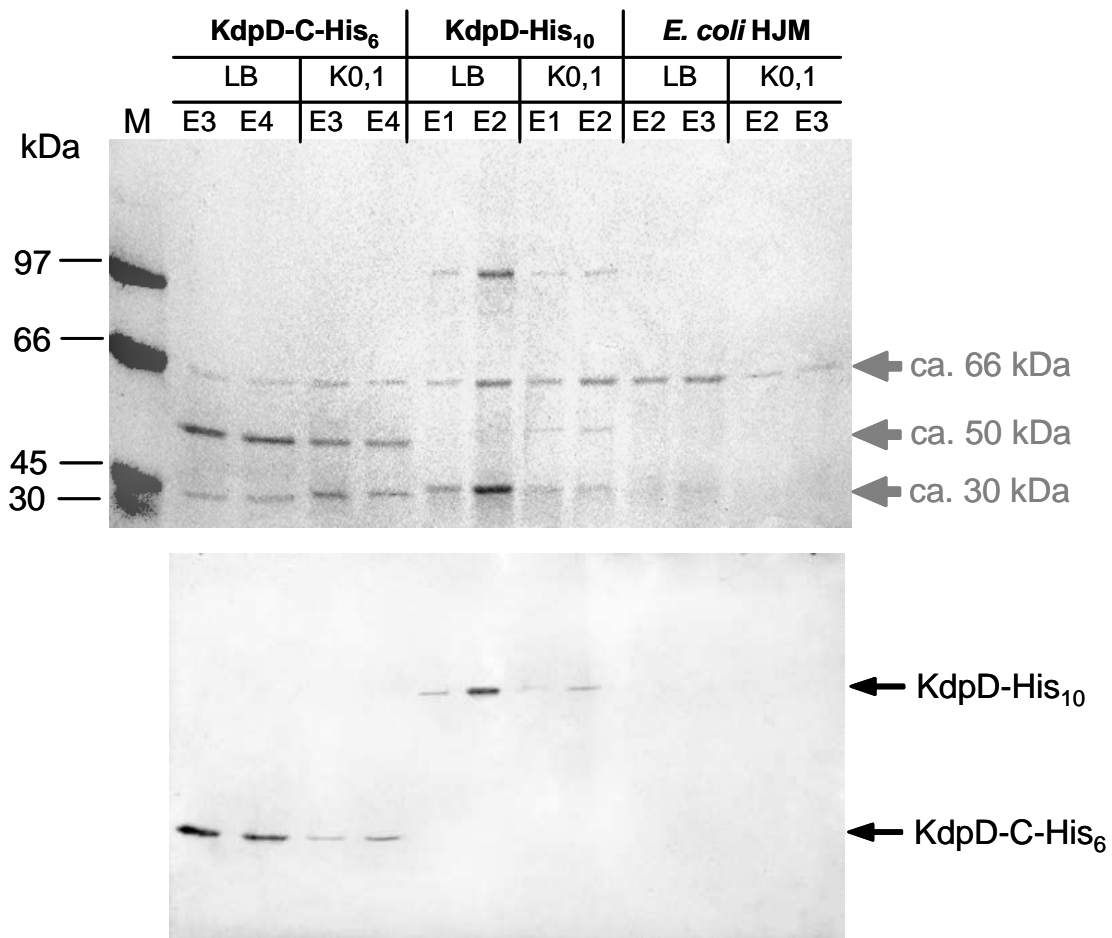


Abb. 45 Vergleich der Reinigungsergebnisse aus verschiedenen Medien. SDS-Page (12,5%) Analyse Comassie gefärbt (oben) und Westernblot mit His-Antikörper (unten) der gereinigten KdpD-His₁₀ und KdpD-C-His₆ Proteine. M = Marker, E1 bis E4 = Eluationsfraktion 1 bis 4, LB = Reinigung aus dem LB-Medium, K0,1 = Reinigung aus dem K0,1-Minimalmedium. Die grauen Pfeile zeigen bei dem SDS-Gel die Banden der coeluierten Banden. Als Kontrolle wurde der *E. coli* Stamm HJM (s. 2.2.8.7) ohne Plasmid auch aus LB-Medium und K0,1-Minimalmedium gereinigt.

Die Ergebnisse der Reinigungen aus den verschiedenen Medien zeigen, dass bei der Reinigung von KdpD und KdpD-C aus dem K0,1-Minimalmedium eine geringere Proteinmenge entsteht (s. Abb. 45). Betrachtet man die coeluierten Banden (s. Abb. 45 Pfeile), die nicht mit dem His-Antikörper reagieren, ist ein Unterschied zwischen den Reinigungen aus den verschiedenen Medien zu sehen. Bei der KdpD-C Reinigung aus dem K0,1-Minimalmedium sind die zusätzliche Proteinbanden auf dem SDS-Gel (Abb. 45, Spur 4 und 5) bei ca. 66 kDa und ca. 30 kDa stärker als bei den Fraktionen aus dem LB-Medium. Bei der Reinigung von KdpD aus dem K0,1-Minimalmedium (Abb. 45, Spur 8 und 9) ist eine zusätzliche Proteinbande bei ca. 50 kDa auf dem SDS-Gel zu sehen, die nicht mit dem His-Antikörper reagiert. Bei der Kontroll-Reinigung von *E. coli* HJM aus dem LB-Medium und K0,1-Minimalmedium (Abb. 45, Spur 10 bis 13) ist auf den SDS-Gel eine Bande bei ca. 66 kDa zu sehen. Auch diese coeluierten Bande reagierte nicht auf den His-Antikörper und war auf dem Westernblot nicht zu sehen.

3.11 Massenspektrometrische Untersuchung der coeluierten Proteinbanden

Um mehr über diese coeluierten, unbekannt Proteine bei ca. 30 kDa und 66 kDa zu erfahren wurden diese zur Analyse nach Heidelberg zu Herr Professor Bernd Bukau ins Zentrum für Molekulare Biologie geschickt. Hierfür wurden die Fraktionen der KdpD und KdpD-C Reinigung (s. 3.7 und 3.8) konzentriert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und Comassie gefärbt. Die 2 Proteinbanden bei ca. 66 kDa und bei ca. 30 kDa wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht.

Die Massenspektrometrie ist eine Untersuchungstechnik für freie, gasförmige Ionen im Hochvakuum, wobei ein sogenannter Masseanalysator einen Ionenstrahl hinsichtlich des Masse/Ladungs-Quotienten auftrennt. Eingang in die Biowissenschaften fand die Massenspektrometrie über die Entwicklung neuer Ionisierungstechnologien und mittlerweile gilt sie als etablierte biochemische Analyseverfahren.

Bei der massenspektrometrischen Untersuchung zeigte sich, dass es sich bei dem ca. 30 kDa großen Protein um die Cytochromoxidase A (CyoA) handelte und bei dem ca. 66 kDa großen Protein um die Glucosamin-6-phosphat-Synthase (GlmS).

3.12 Native Gelelektrophorese zur Untersuchung der Komplexbildung

Um mehr über die Komplexbildung von KdpD-C zu erfahren, wurde eine native Gelelektrophorese (s. 2.3.17) durchgeführt. Bei dieser Art der Gelelektrophorese werden die aufgeschlossenen, induzierten Zellen mit dem exprimierten KdpD-C Protein mit Detergenz versetzt. Hierbei ist es wichtig das richtige Detergenz in der richtigen Konzentration zu verwenden. Ist das Detergenz zu stark, oder die Konzentration zu hoch sieht man auf dem nativen Gel nur Monomere. Ist das Detergenz zu schwach, sieht man keine Auftrennung der Komplexe.

3.12.1 Blue Native Gel

Mit Hilfe des Blue-Native Gels nach Schägger (Schägger und von Jagow, 1991; Schägger et al. 1994) sollte die Komplexbildung von KdpD-C untersucht werden.

Bei den nativen Gelen erfolgt, im Gegensatz zu den SDS-Gelen, eine Auftrennung nach Proteinkomplexen. Die spezifischen Ladungen der Proteinkomplexe wird durch die Anlagerung des anionischen Farbstoffs Coomassie Blau überdeckt, so dass die Komplexe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Um eine gute Auflösung der Proteinkomplexe zu erreichen, wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers ein Gradienten-Gel (4% bis 16,5% Acrylamid) hergestellt (s. 2.3.17.1).

3.12.2 Blue Native Gelelektrophorese

Auf dem Westernblot des Blue Native Gels sind verschiedenen Komplexe zu sehen. Die Komplexe wurden gut durch die Zugabe von 1,5% Sarkosyl aufgetrennt (Abb. 46, Spur 4). Zwischen 30 und 66 kDa ist KdpD-C als Monomer und bei ca. 120 kDa ist das dimere KdpD-C zu sehen. Aber es gibt noch weitere Komplexe, die enthalten (s. Abb. 46), die eine Reaktion mit dem His-Antikörper auf dem Westernblot (s. 2.3.13) zeigen und somit das KdpD-C enthalten. Ob es sich um KdpD-C-Oligomere handelt oder der Komplex noch andere Bestandteile enthält ist daraus nicht zu ersehen.

Bei den Detergenzien Triton und Dodecyl- β -maltosid sind auch Komplexe zu sehen, aber die Auftrennung ist nicht optimal (Abb. 46, Spur 2 und 3).

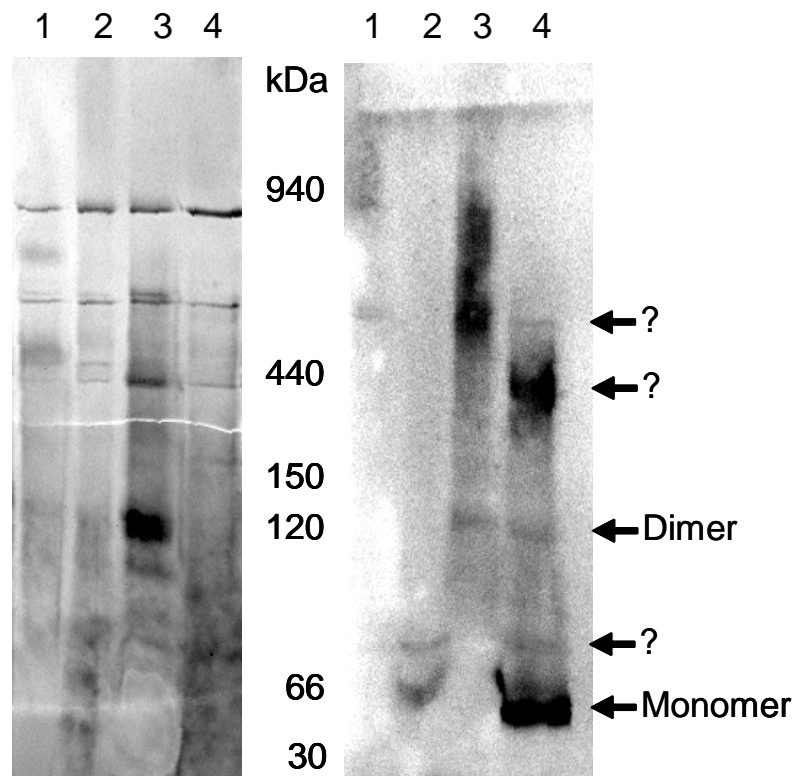


Abb. 46 Blue-Native Gel (links) und Westernblot mit His-Antikörper (rechts) zur Untersuchung der Komplexbildung von KdpD-C. Es wurden unterschiedlich starke Detergenzien zugegeben. Das KdpD-C-His₆ Protein wurde mit Hilfe des His-Antikörpers nachgewiesen. 1 = 1% Digitonin; 2 = 0,15% Triton; 3 = 0,1% Dodecyl- β -maltosid; 4 = 1,5% Sarkosyl.

3.12.3 2D-Gelelektrophorese der nativen Komplexe

Um die Bestandteile des nativen Komplexes des Blue Native Gels genauer zu untersuchen, wurde die durch Zugabe von 1,5% Sarkosyl aufgetrennten Komplexe bei ca. 440 kDa aus dem Blue Native Gel ausgeschnitten (s. 3.13.1) und in ein SDS-Gel gegossen. Dazu wurde ein Trenngel (12,5% SDS) gegossen. Der ausgeschnittene Gelstreifen wurde dann horizontal in das Sammelgel miteingegossen. Nachdem das Gel auspolymersiert war wurde eine herkömmliche SDS-Gelelektrophorese durchgeführt (s. 2.3.12). Danach wurde das SDS-Gel geblottet und ein Antikörper-Nachweis mit einem KdpD-Antikörper (s. 2.3.13) durchgeführt.

In dem SDS-Gel wurden die drei nativen Komplexe (s. Abb. 47a, b, c) bei ca. 440 kDa aufgetrennt. Mit Hilfe eines Westernblots und eines KdpD-Antikörpers wurde KdpD-C als Bestandteil in zwei der drei Komplexe nachgewiesen.

Bei dem Komplex „a“ war auf dem SDS-Gel das KdpD-C Protein und ein ca. 66 kDa großen Protein zu sehen. Dieses unbekannte Protein konnte auf dem Westernblot nicht nachgewiesen werden. Der Komplex „b“ beinhaltete zusätzlich zu dem KdpD-C und dem 66 kDa Protein noch ein ca. 30 kDa großes Protein, welches ebenfalls nicht mit dem KdpD-Antikörper reagierte (s. Abb. 47).

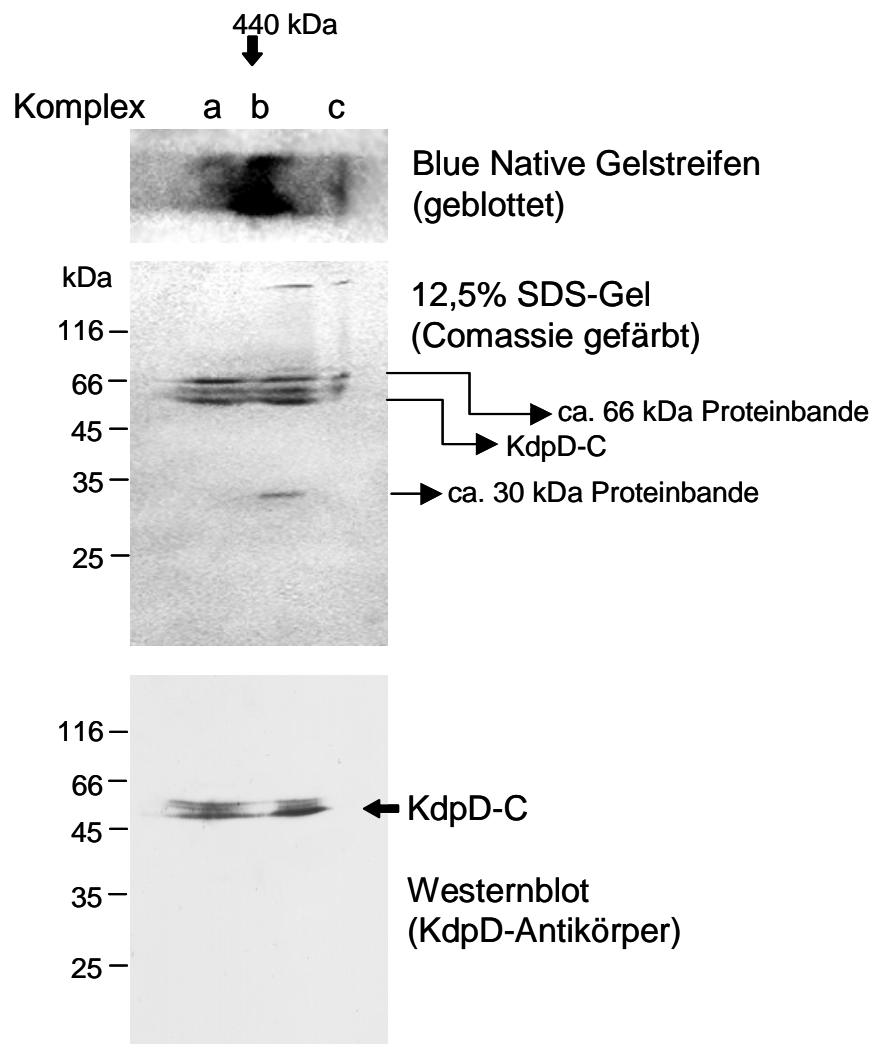


Abb. 47 Auftrennung der nativen Komplexe bei ca. 440 kDa in einem SDS-Gel. Der Blue Native Gelstreifen (links 16,5%, rechts 4%) wurde in das Sammelgel eines 12,5% SDS-Gel eingegossen (oben). Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde geblottet und das KdpD-C Protein mit Hilfe des KdpD-Antikörpers nachgewiesen (unten). Die zwei interessanten, unbekannt Proteine (ca. 66 kDa und ca. 30 kDa) wurden mit Pfeilen markiert.

Zusätzlich war eine Proteinbande am Übergang vom Sammelgel in das Trenngel zusehen. Hierbei könnte es sich um zu große Proteine, oder nicht aufgetrennte Bestandteile des Komplexes gehandelt haben. Dies war auch bei dem Komplex „c“ zu beobachten. Dieser Komplex beinhaltete das ca. 66 kDa große Protein, aber KdpD-C konnte durch den Westernblot nicht eindeutig als Bestandteil nachgewiesen werden (s. Abb. 47).

4. DISKUSSION

Die Expression des *kdpFABC* Operons wird über die membrangebundene Sensor kinase KdpD und den Antwortregulator KdpE, die ein Sensor kinase/Antwortregulator-System in *E. coli* bilden, reguliert. Dieses Operon codiert für den hochaffinen K^+ -Transportkomplex des Kdp Systems (Walderhaug *et al.*, 1992). Die Sensor kinase KdpD aus *E. coli* ist ein 98 kDa großes Membranprotein mit insgesamt 894 Aminosäuren. Es hat vier Transmembranhelices, eine große cytoplasmatische Inputdomäne am N-Terminus, sowie eine große, cytoplasmatische, C-terminale Transmitterdomäne (Zimmann *et al.*, 1995; Parkinson und Kofoed, 1992). Durch seine außergewöhnlich lange, hydrophile N-terminale Domäne unterscheidet sich das regulatorische Protein KdpD von den anderen bekannten Sensor kinasen (Puppe *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1998a). Dem N-terminalen Teil wird eine regulierende Funktion zugeschrieben (Puppe *et al.*, 1996). Durch einen Stimulus kommt es innerhalb der als Dimer vorliegenden Sensor kinase KdpD zu einer Konformationsänderung (Heermann *et al.*, 1998), die eine Autophosphorylierung am His 673 in der C-terminalen Domäne zur Folge hat. Der Phosphatrest wird daraufhin von KdpD auf KdpE übertragen, welches nun vor der Promotorregion binden kann und die Transkription der *kdpFABC*-Struktur gene initiiert (Sugiura *et al.*, 1992; Nakashima *et al.*, 1993).

Bei vorherigen Untersuchungen wurde KdpD zwischen Helix 2 und Helix 3 getrennt. Daraus resultieren die beiden Fragmente KdpD-N (AS 1-448) und KdpD-C (AS 444-894). Das KdpD-N Fragment besteht aus Helix 1, Helix 2 und der cytoplasmatische N-terminalen Domäne. Die Helices 3 und 4 zusammen mit dem cytoplasmatischen C-terminalen Bereich bilden KdpD-C (Facey und Kuhn, 2003). Die Überprüfung der Funktionalität der beiden KdpD-Konstrukte zeigte, dass KdpD-N nicht funktionsfähig war. Dagegen zeigte KdpD-C eine hohe Aktivität und reagierte auf eine Erhöhung der K^+ -Konzentration im Medium mit einer Reduzierung seiner Aktivität, konnte jedoch nicht komplett deaktiviert werden (Rothenbücher, 2000).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden neue Konstrukte hergestellt, die sowohl Deletionen bei den Helices, als auch Veränderungen der Loops beinhalten. Auf diese Weise sollte der funktionelle Teil für die K^+ -Sensing der Sensor kinase KdpD ermittelt werden.

4.1 Wachstumstest im Minimalmedium

Hohe K^+ -Konzentration im Medium inaktivieren das Kdp-System. Dabei wird die phosphorylierende Aktivität von KdpD gehemmt und die Expression der *kdp*-Gene unterdrückt (Roe *et al.*, 2000). Dieser Effekt tritt schon bei einer Konzentration ab 2 mM Kalium im Medium ein (Altendorf und Epstein, 1996). Es wird vermutet, dass KdpD durch zwei unterschiedliche Stimuli aktiviert wird, Begrenzung der K^+ -Konzentration und Erhöhung der Osmolarität (Jung und Altendorf, 1998a). Um die Funktionalität der KdpD-Konstrukte zu testen, wurde für den Wachstumstest ein Minimalmedium mit einer K^+ -Konzentration von 0,1 mM gewählt, da bei dieser niedrigen Konzentration das Kdp System aktiv und essentiell ist (Roe *et al.*, 2000).

Die *E. coli* TKV2208 Zellen wurden für diesen Test zunächst im LB-Medium herangezogen und dann in K0,1-Minimalmedium überimpft. Um auszuschließen, dass das Wachstum durch das bei der Überimpfung mitgeführte Kompletmedium herrührt, wurden die Zellen vorher zweimal mit dem K0,1-Minimalmedium gewaschen. Die Ergebnisse des Wachstumstestes in flüssigem K0,1-Minimalmedium zeigen, dass alle Konstrukte, bis auf die Negativkontrollen (pBAD18 und KdpD-N), gewachsen waren und somit die Fähigkeit besitzen den *E. coli* Stamm TKV2208 zu komplementieren. Dies wurde mit der Wiederholung des Versuches auf festem K0,1-Minimalmedium bestätigt. Diese bedeutet, dass KdpD-C funktionsfähig ist (s. 3.2).

4.2 Wachstumskurve der KdpD-Konstrukte

Um mehr über die Eigenschaften der KdpD-Konstrukte zu erfahren, wurde das Wachstumsverhalten in K0,1-Minimalmedium untersucht. Die Ergebnisse zeigen das unterschiedliche Wachstumsverhalten der verschiedenen Konstrukte (s. Abb. 32, S. 73). Die Konstrukte C494-894 und C499-894 zeigen ein dem Wildtyp KdpD sehr ähnliches Wachstumsverhalten. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, insbesondere da diese KdpD-Konstrukte C494-894 und C499-894 fast nur aus der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne bestehen und keine oder nur eine stark verkürzte Transmembrandomäne haben. Dies bestätigt die Ergebnisse von Heermann und Mitarbeitern, die die Transmembrandomänen von KdpD als nicht essentiell für das K^+ -Sensing einstufen. Aufgrund ihrer Ergebnisse entwickelten sie ein Modell, bei dem die räumliche Anordnung der cytoplasmatischen C- und N-

terminalen Domäne zueinander für die Aktivierung des Sensors entscheidend ist (Hermann *et al.*, 2003a). Da meine Ergebnisse aber zeigten, dass die cytoplasmatische C-terminale Domäne ausreicht um den *kdpD*-Deletionsstamm zu komplementieren (s. 4.1) und auch die Wachstumskurve mit der des Wildtyps KdpD sehr ähnlich ist, ist die Annahme, dass das Zusammenspiel der beiden cytoplasmatischen Domänen essentiell für das K^+ -Sensing ist, in Frage gestellt.

Um die Sensoraktivität genau zu untersuchen, wurden die KdpD-Konstrukte in den *E. coli* Stamm HAK006 transformiert und die Aktivität mit Hilfe des β -Galaktosidase Nachweises bestimmt und miteinander verglichen.

4.3 Bestimmung und Vergleich der β -Galaktosidase Aktivität

Mit dem β -Galactosidase Nachweis (s. 2.3.10) kann die Aktivität der verschiedenen Konstrukte von KdpD als Induktor für *kdpFABC* quantitativ verglichen werden. Dafür wurde der *E. coli* Stamm HAK006 verwendet, da dieser die Fähigkeit besitzt β -Galaktosidase in Abhängigkeit von phosphoryliertem KdpD herzustellen. Findet eine Induktion statt, spaltet die produzierte β -Galaktosidase das zugegebene Ersatzsubstrat oNPG. So kann die Aktivität der einzelnen KdpD-Konstrukte untersucht und miteinander verglichen werden.

4.3.1 KdpD-Konstrukte mit 4 transmembranen Helices

Die Untersuchung der β -Galaktosidase Aktivität der KdpD-Konstrukte mit 4 Helices zeigt, dass der Einbau eines Tags in die periplasmatische Schleife (KdpD/1-Tag-2 und KdpD/3-Tag-4) einen leicht reduzierenden Effekt auf die β -Galaktosidase Aktivität der Konstrukte hat. Verglichen mit dem Wildtyp (ca. 3400 Units) zeigen KdpD/1-Tag-2 und KdpD/3-Tag-4 (beide ca. 2800 Units) eine um ca. 600 Units reduzierte Aktivität. Dabei macht es anscheinend keinen Unterschied in welche periplasmatische Schleife das Tag eingebaut wurde. Beide KdpD-Konstrukte sind noch in der Lage die Erhöhung der K^+ -Konzentration im Medium zu registrieren und *kdpFABC* zu reprimieren (s. Abb. 48).

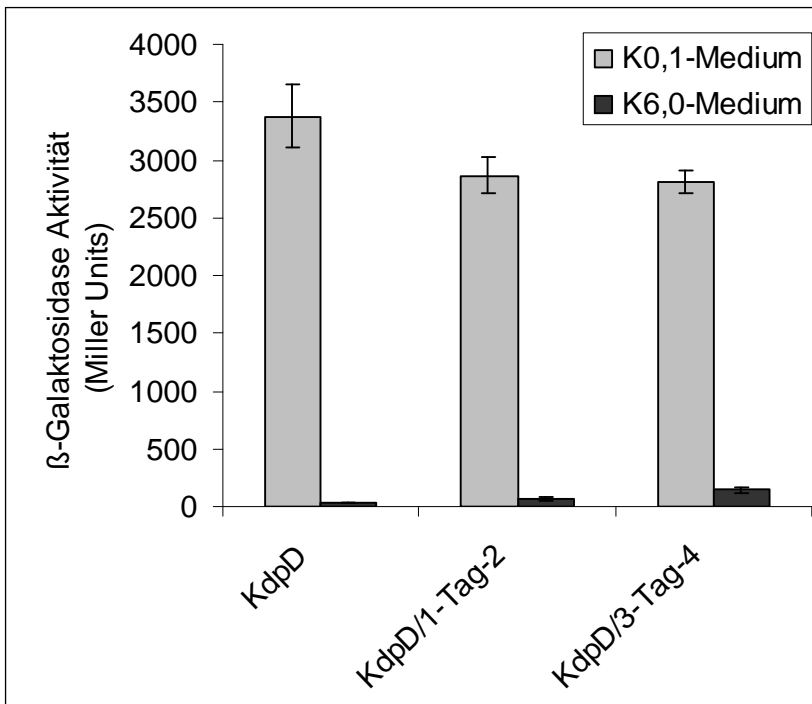


Abb. 48 Vergleich der β -Galaktosidase Aktivität der KdpD-Konstrukte mit 4 Helices mit dem Wildtyp KdpD. Die Daten wurden aus Abb. 33 zusammengestellt.

Werden in beide periplasmatische Schlaufen Tags eingebaut (KdpD+2Tags) so reduziert sich die Aktivität des KdpD-Konstruktes, verglichen mit dem Wildtyp, um ca. 1400 Units. Beim Vertauschen der Helices (KdpD/3412) beobachtet man einen ähnlich starken Effekt. Auch hier sind beide KdpD-Konstrukte in der Lage auf die Änderungen der K^+ -Konzentration zu reagieren (s. Abb. 49).

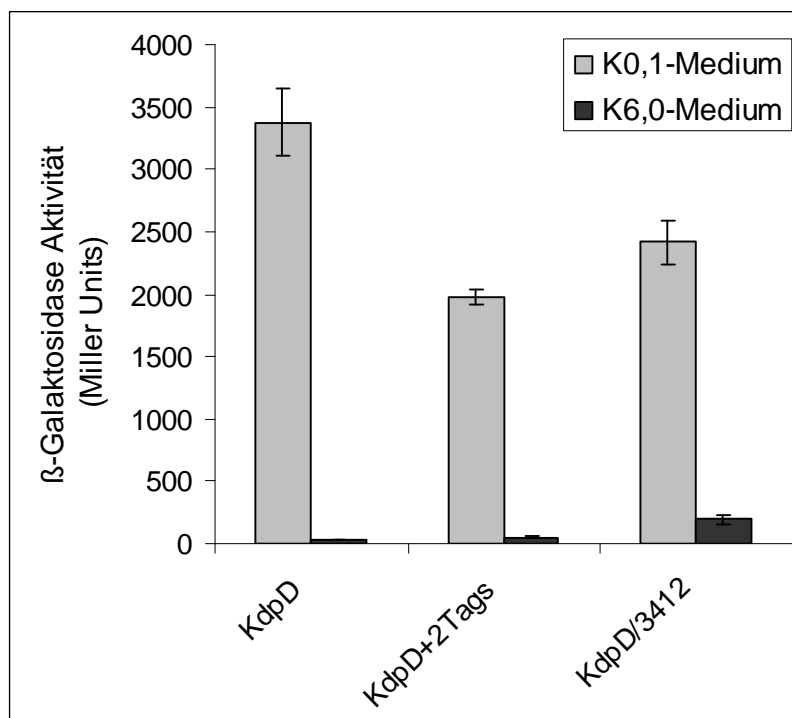


Abb. 49 Vergleich der β -Galaktosidase Aktivität der KdpD-Konstrukte mit 4 Helices mit dem Wildtyp KdpD. Die Daten wurden aus Abb. 33 zusammengestellt.

Alle KdpD-Konstrukte mit 4

Helices waren funktionstüchtig und fähig die K^+ -Konzentrationen und deren Änderungen im Medium zu detektieren. Erhebliche Änderungen in der Anordnung der transmembranen Helices (Helixabstände, „domain swapping“) hatten nur geringe Wirkung auf die Sensoraktivität.

4.3.2 KdpD-Konstrukte mit 2 transmembranen Helices

Die Aktivität der KdpD-Konstrukte mit 2 Helices wurde ebenfalls mit Hilfe des β -Galaktosidase Nachweises bestimmt und mit der Aktivität des KdpD Wildtyps verglichen. Dabei zeigten die von KdpD-C ausgehenden Konstrukte, mit den Helices 3 und 4, eine hohe Aktivität (s. Abb. 50).

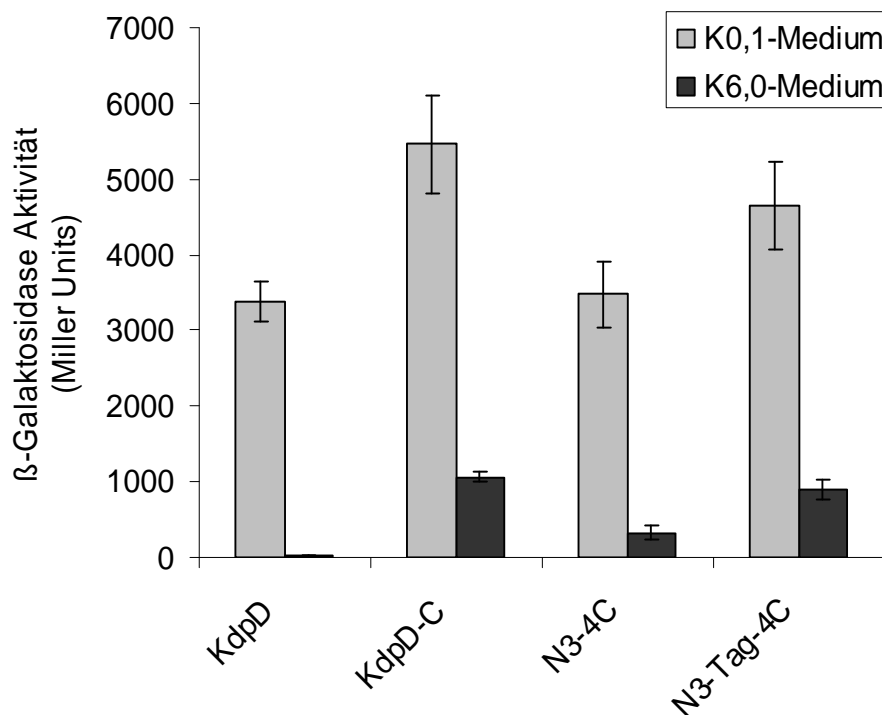


Abb. 50 Vergleich der β -Galaktosidase Aktivität der KdpD-Konstrukte mit 3 und 4 Helices mit dem Wildtyp KdpD. Die Daten wurden aus den Abb. 33 und 34 zusammengestellt.

KdpD-C zeigte im K0,1-Minimalmedium eine hohe Aktivität (ca. 5500 Units) die sich bei Zugabe von KCl zum Medium reduziert, aber nicht ganz abschalten lässt (ca. 1000 Units). Dies könnte damit zusammenhängen, dass zum Beispiel KdpE nicht mehr vollständig dephosphoryliert wird. Jedoch hatte Heermann *et al.* (2003) zum Beispiel bei seiner KdpD-Mutante KdpD/ Δ TM3-4, die ebenfalls eine relativ hohe Restaktivität im K^+ -reichen Medium zeigte, eine hohe Kinase Aktivität (426%) und Phosphatase Aktivität (266%) nachgewiesen. Auch der Transfer der Phosphatgruppe zu KdpE konnte beobachtet werden.

Bei dem Modell der Signaltransduktion von Heermann und Mitarbeitern, wird das System über die Interaktion der cytoplasmatischen N-terminalen und C-terminalen Domänen miteinander reguliert (Heermann *et al.*, 2003). Da jedoch auch KdpD-C eine Aktivität zeigt, die auf die Änderungen der K^+ -Konzentrationen reagiert, kann diese Interaktion der cytoplasmatischen Domänen nicht essentiell für die Regulierung des Kdp-Systems sein. Es könnte sich dabei um ein „Feintuning“ handeln, da KdpD-C auch bei hohen K^+ -Konzentrationen eine Restaktivität zeigte. Wurde die cytoplasmatische N-terminale Domäne an KdpD-C ligiert, wodurch N3-4C entstand, zeigte das Konstrukt eine dem KdpD Wildtyp vergleichbare Aktivität (s. Abb. 50). Auf Grund dieser Beobachtungen, kann man der cytoplasmatischen N-terminalen Domäne eine gewisse regulierenden Funktion, wie sie auch schon von Jung und Altendorf (1998a) beschrieben wurde, zuschreiben.

Durch den Einbau des Tags in die periplasmatische Schleife von N3-4C, wodurch N3-Tag-4C entstand, wird diese Interaktion anscheinend durch die dadurch entstandene Konformationsänderung gestört, denn die Aktivität ähnelt eher der von KdpD-C. Auch hier ist eine relativ hohe Restaktivität zu beobachten (s. Abb. 50).

Bei den KdpD-Konstrukten, die von dem inaktiven KdpD-N ausgehend entwickelt wurden, wurde untersucht, ob man wieder eine Aktivität erlangen kann (Abb. 51). Dazu wurde die cytoplasmatische C-terminale Domäne an Helix 2 kloniert (N1-2C). Bei der Untersuchung zeigte N1-2C eine Aktivität, die auch auf die Änderungen der K^+ -Konzentration im Medium reagierte. Dabei scheint es keinen Unterschied zu machen, ob es sich bei den zwei Helices um Helix 1 und 2 (N1-2C) oder Helix 1 und 4 (N1-4C) handelt, denn die Aktivität dieser zwei Konstrukte ist fast identisch (s. Abb. 51). Der Einbau des Tags (N1-Tag-2C) in die periplasmatische Schleife wirkt sich wie bei N3-Tag-4C (s. Abb. 50) auf die Aktivität bei 0,1 mM KCl aus. Auch hier war eine erhöhte Aktivität zu beobachten, die eventuell auf die Konformationsänderung der cytoplasmatischen Domänen zueinander zurück zu führen ist.

Insgesamt zeigten die KdpD-Konstrukt N1-2C, N1-Tag-2C und N1-4C eine regulierbare Aktivität (ca. 1200 bis 1600 Units), die aber nicht die Aktivität des Wildtyps (ca. 3500 Units) erreichte. Anscheinend ist die cytoplasmatische C-terminale Domäne hier der für die Aktivität der Konstrukte entscheidende Bestandteil.

Um dies genauer zu untersuchen, wurden weitere KdpD-Konstrukte ausgehend von KdpD-C mit noch größeren Deletionen hergestellt und untersucht.

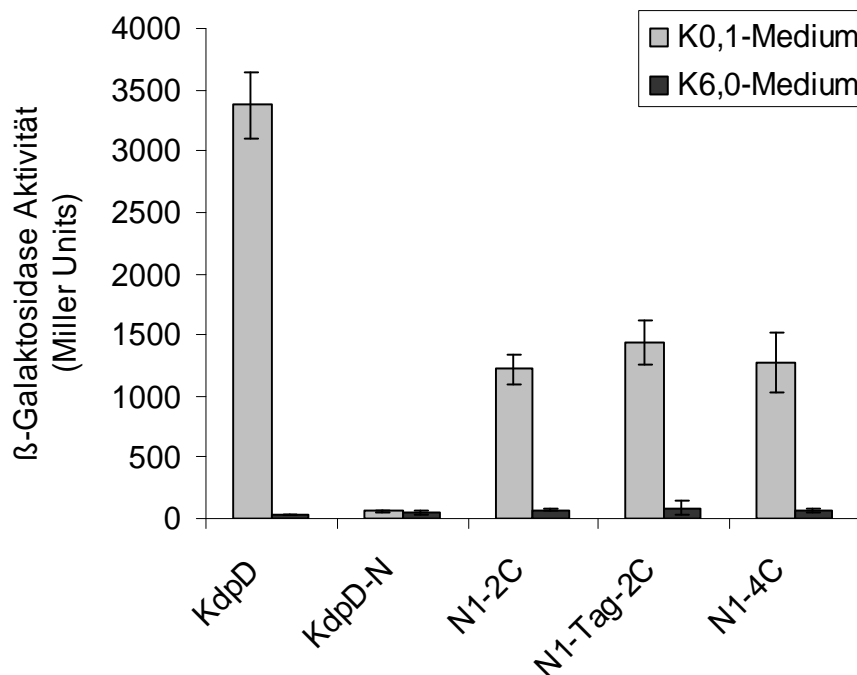


Abb. 51 Vergleich der β -Galaktosidase Aktivität der KdpD-Konstrukte, die von KdpD-N ausgehend entwickelt wurden mit dem Wildtyp KdpD. Die Daten wurden aus Abb. 34 zusammengestellt.

4.3.3 KdpD-Konstrukte mit einer oder keiner transmembranen Helix

Da KdpD-C eine regulierbare Sensoraktivität zeigte, die mit dem Wildtyp vergleichbar war, wurden Konstrukte ausgehend von KdpD-C hergestellt, bei denen weitere Teile deletiert wurden (s. 3.4).

Bei der Überprüfung der β -Galaktosidase Aktivität der Konstrukte mit der Helix 4 und dem cytoplasmatischen C-terminalen Teil (H4+C), stellte sich heraus, dass eine regulierbare Aktivität nachweisbar ist. H4+C zeigt im Vergleich mit KdpD (ca. 3500 Units) eine ähnliche Aktivität (ca. 2000 Units), die sich durch die Zugabe von KCl zum Medium verringert. Vergleicht man H4+C allerdings mit KdpD-C, so sieht man eine stark reduzierte Aktivität (s. Abb. 52).

Bei dem Konstrukt H4+C+RR wurden zwei Argininreste N-terminal an Helix 4 kloniert, wodurch die Insertion in die Membran verhindert werden soll. Mit der Natriumcarbonatextraktion wurde H4+C+RR, wie auch H4+C, jedoch hauptsächlich im Pellet nachgewiesen (s. Abb. 36, S. 81). Dies zeigt, dass diese Proteine noch an

der Membran gebunden bleiben. Diese Bindung konnte auch nicht durch die Waschung mit Natriumcarbonat gelöst werden.

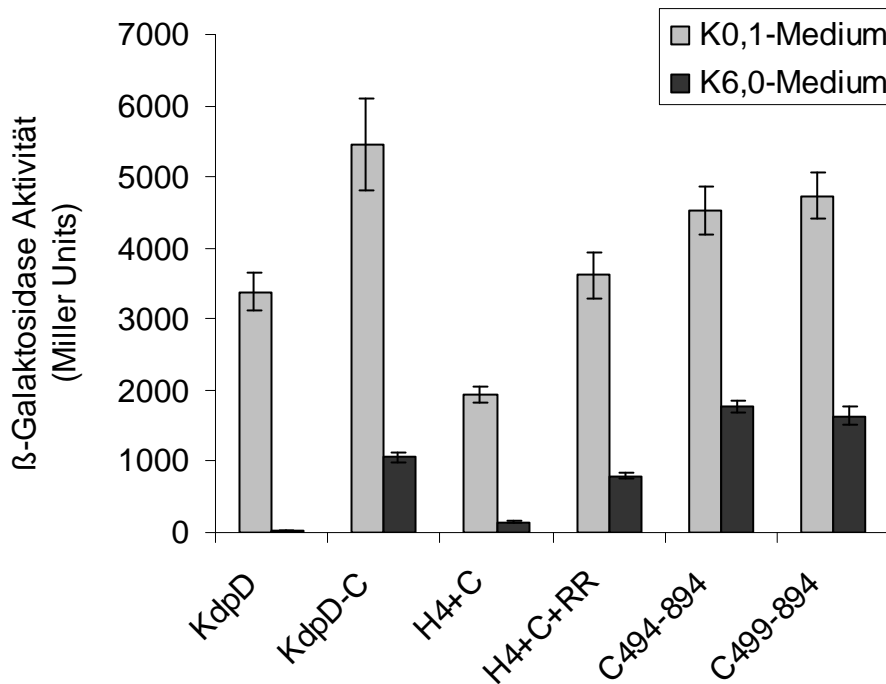


Abb. 52 Vergleich der β -Galaktosidase Aktivität der KdpD-Konstrukte mit einer oder keiner Helix mit dem Wildtyp KdpD und KdpD-C. Die Daten wurden aus Abb. 35 zusammengestellt.

Die Veränderung, die durch die zwei Argininreste (H4+C+RR) verursacht wird, hat auch einen Einfluss auf die Aktivität. Bei einer K^+ -Limitierung ist eine erhöhte Aktivität, ähnlich der des KdpD Wildtyps, zu beobachten. Bei Erhöhung der K^+ -Konzentration im Medium bleibt eine Restaktivität, die mit der von KdpD-C vergleichbar ist (s. Abb. 52). Dennoch sind auch diese Konstrukte funktionsfähige K^+ -Sensoren.

Bei der Untersuchung der Membranlokalisation der KdpD-Konstrukte C494-894 und C499-894 mit Hilfe der Natriumcarbonat-Methode zeigte sich dann doch ein Unterschied, der durch die 4 restlichen Aminosäuren der Helix 4 bei C494-894 verursacht wird. Im Gegensatz zu KdpD-C, das wie der KdpD Wildtyp im Pellet (P) lokalisiert war, war C494-894 relativ gleichmäßig sowohl im Pellet, wie auch im Überstand (Ü) zu sehen (s. Abb. 36, S. 81). Durch die 4 hydrophoben Aminosäuren, die noch von Helix 4 vorhanden sind, hat C494-894 immer noch eine gewisse Affinität zur Membran. Durch die Waschung mit Natriumcarbonat ist zwar ein großer Teil der an der Membran angelagerten Proteine in den Überstand gelangt, dennoch

ist etwas mehr als die Hälfte der Proteine noch an der Membran lokalisiert (s. Abb. 36, S. 81).

Bei dem KdpD-Konstrukt C499-894 ist die Helix 4 komplett deletiert, so dass es nur aus der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne besteht. Dies hat auch eine Auswirkung auf seine Membranlokalisation. Im Gegensatz zu C494-894 ist dieses Protein hauptsächlich im Überstand lokalisiert (s. Abb. 36, S. 81). Nur ein geringer Teil ist in der Pelletfraktion zu sehen; dies könnte damit zusammenhängen, dass bei starker Überexpression des Proteins Reste an der Membran nicht ausreichend mit Natriumcarbonat gewaschen wurden.

Hat die Membranlokalisation denn überhaupt eine entscheidende Auswirkung auf die Funktionalität der KdpD-Konstrukte? Bei dem KdpD-Konstrukt C494-894 sind nur noch 4 Aminosäuren der Helix 4 vorhanden, wodurch es eher an der Membran lokalisiert ist. Bei dem löslichen C499-894 ist die Helix 4 komplett deletiert. Doch dieser Unterschied scheint keinen Einfluss auf die Aktivität zu haben. Beide KdpD-Konstrukte haben sowohl unter K^+ -Limitierung als auch nach Zugabe von KCl zum Medium eine fast identische Aktivität (s. Abb. 52). Diese hat Ähnlichkeit mit der von KdpD-C, auch hier ist eine hohe Restaktivität (ca. 1800 Units) zu beobachten. Dennoch besitzen C494-894 und C499-894 immer noch die Fähigkeit auf die Zugabe von KCl zum Medium zu reagieren und reduzieren die Aktivität. Sie sind also funktionsfähige K^+ -Sensoren.

Die von Heermann *et al.* konstruierte KdpD-Mutante KdpD/ Δ TM1-4, die nur aus den cytoplasmatischen Domänen besteht, zeigte eine mit KdpD-C und C499-894 vergleichbare Aktivität und auch eine relativ hohe Restaktivität (ca. 1000 Units). Die Untersuchungen zur Membranlokalisation zeigten allerdings, dass 50% von KdpD/ Δ TM1-4 noch an der Membran lokalisiert waren.

Meine Ergebnisse zeigen, dass die transmembranen Helices nicht essentiell für die Signaltransduktion sind. Auch Heermann und Mitarbeiter (2003a) kamen zu diesem Schluss. Sie nahmen jedoch an, dass sie wichtig für die korrekte Positionierung der cytoplasmatischen Domänen zueinander sind. Da jedoch C499-894, das nur aus der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne besteht, ein funktionsfähiger K^+ -Sensoren

ist, ist hier auch die Positionierung der transmembranen Helices zueinander nicht essentiell für das K^+ -Sensing. Durch die diversen Veränderungen in KdpD ändert sich die Aktivität der Konstrukte zwar quantitativ, jedoch nicht qualitativ. Dies führt zu der Annahme, dass der Mechanismus des K^+ -Sensing auf der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne lokalisiert ist, oder dass eventuell ein weiteres unbekanntes Protein den Mechanismus in Gang setzt. Dabei ist eine Membraninsertion nicht unbedingt notwendig. Dies widerspricht dem Modell von Heermann und Mitarbeitern, bei dem die Interaktion der beiden cytoplasmatischen Domänen essentiell für das K^+ -Sensing sind (Heermann *et al.*, 2003a). Dennoch könnte eine solche Interaktion in gewisser Weise ein Bestandteil der Regulation sein, da bei den Konstrukten C494-894 und C499-894 eine relativ hohe Restaktivität gemessen wurde.

Betrachtet man die Ergebnisse kann man zu dem Schluss kommen, dass sowohl die Positionierung in der Membran, die Konformation, die Transmembrandomänen, so wie die cytoplasmatische N-terminale Domäne eine Einfluss auf die korrekte Funktion der KdpD-Sensorkinase haben. Sie sind jedoch nicht essentiell für das K^+ -Sensing.

4.4 Das KdpD-Konstrukt C499-894 ist ein K^+ -Sensor

KdpD-C und C499-894 stellen sich bisher als funktionsfähige K^+ -Sensoren dar. Um diese KdpD-Konstrukte noch genauer zu untersuchen, werden ihre Reaktionen beim Anschalten und Abschalten des Systems mit dem Wildtyp KdpD verglichen.

Bei der Aktivierung reagieren KdpD-C und C499-894 ähnlich dem Wildtyp KdpD. Die KdpD-Konstrukte sind auch in der Lage zwischen KCl, LiCl und RbCl zu differenzieren und ihre Reaktionen dementsprechend, wie beim Wildtyp KdpD beobachtet, anzupassen (s. Abb. 39, S. 88).

Bei der Zugabe von 6 mM RbCl in das K0,1-Minimalmedium kann eine um ca. 50% reduzierte Aktivität beobachtet werden (s. Abb. 39, S. 88). Dies kann damit zusammenhängen, dass K^+ und Rb^+ einen ähnlichen Ionenradius haben. Dies wurde bei einem Assay mit radioaktivem Rubidium ($^{86}Rb^+$) gezeigt, bei dem die Fließigenschaften innerhalb des K^+ -Kanals untersucht wurde (Heginbotham *et al.*, 1998). Aus diesem Grund kann es auch hier zu einer Reduzierung der Aktivität durch

die Zugabe von RbCl kommen, die jedoch nicht so stark ist, wie bei der Zugaben der gleichen Menge an KCl (s. Abb. 39, S. 88). Auch die Inaktivierungskinetik von KdpD-C und C499-894, nach Zugabe von KCl zum Medium, ist der des Wildtyp KdpD sehr ähnlich (s. Abb. 40, S. 90).

Die Untersuchungen der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik haben gezeigt, dass das lösliche C499-894 ein funktioneller K^+ -Sensor ist, der sogar noch die Fähigkeit besitzt zwischen K^+ , Rb^+ und Li^+ zu selektieren. Diese Ergebnisse widerlegen eindeutig das Modell von Heermann und Mitarbeitern, bei dem die cytoplasmatische N-terminale und die C-terminale Domäne miteinander agieren müssen, damit die Signaltransduktion stattfindet (Heermann *et al.*, 2003a). Die Signaltransduktion kann auch ohne die cytoplasmatische N-terminale Domäne stattfinden. Dies heißt nicht, dass die N-terminale Domäne von KdpD unwichtig ist. Eine Funktion könnte die Feinregulierung der Aktivität mit Hilfe weiterer Parameter sein. Es wurden zwei ATP-Bindungsstellen (Walker Boxes) in der cytoplasmatischen N-terminalen Domäne entdeckt. Auch konnte nachgewiesen werden, dass über die ATP-Bindung die Phosphatase-Aktivität beeinflusst wird (Jung und Altendorf, 1998a). Der N-terminalen Domäne wird auch eine stabilisierende Funktion gegenüber der Bindung von KdpE~P an die korrespondierende DNA-Bindungsstelle zugeschrieben (Heermann *et al.*, 2003b). Auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigten die KdpD-Konstrukte nach Fusion der cytoplasmatischen N-terminalen Domäne wieder eine bessere Regulierbarkeit (z.B. N3-4C). Wahrscheinlich ist eine Summe verschiedener Signale für eine exakte Regulation von KdpD ausschlaggebend.

4.5 KdpD ein Osmosensor?

Ein weiteres Thema der Arbeit war die Untersuchung der Reaktionen von KdpD auf einen osmotischen Schock. Über den Stimulus der Aktivierung ist bisher noch wenig bekannt und der molekulare Mechanismus wird widersprüchlich diskutiert. In verschiedenen Veröffentlichungen wird die Sensorkinase KdpD als Osmosensor beschrieben, der bei einer hohen Osmolytkonzentration im Medium das Kdp-System aktiviert und somit der Zelle dabei hilft den osmotische Druck auszugleichen (Laimins *et al.*, 1981; Altendorf und Epstein, 1996). Dabei soll der Zellturgor direkt KdpD regulieren (Malli und Epstein, 1998).

Die Idee, dass der Turgor alleine der Stimulus sein kann, wurde inzwischen jedoch durch weitere Untersuchungen wieder entkräftet (Asha und Gowrishankar, 1993; Augiura *et al.*, 1994; Jung und Altendorf, 1998a). Bei Experimenten zeigte KdpD nur eine schwache Reaktion auf die Änderung der Osmolarität verglichen mit der Reaktion bei einer Änderung der K^+ -Konzentration (Heermann *et al.*, 2003a). Jung und Altendorf gehen davon aus, dass hauptsächlich Umweltsignale (z.B. K^+ -Begrenzung), die intrazellulären Parameter verändern, die für die Aktivität von KdpD verantwortlich sind (Jung und Altendorf, 2002).

Auch die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der Turgor allein nicht der primäre Stimulus für die Regulation von KdpD sein kann. Weder Sucrose noch Glycerol konnten eine Reaktion bei KdpD hervorrufen. Lediglich nach der Zugabe von 0,4 bis 0,6 M NaCl konnte eine leichte Reaktion beobachtet werden. Diese ist jedoch auf keinen Fall vergleichbar mit der Reaktion auf eine K^+ -Limitierung im Medium (s. Abb. 37, S. 83). Ist ausreichend K^+ vorhanden und das Kdp-System inaktiv, kann das System nicht allein durch eine Änderung der Osmolarität in den aktiven Zustand übergehen.

KCl (mM)	zugegebenes Salz (100mM)	Aktivität (Miller Units in %)
0,1	-	100
6,0	-	1,4
0,1	NaCl	112
6,0	NaCl	0,7

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen weiter, dass bei einer K^+ -Limitierung im Medium die Aktivität von KdpD durch Zugabe von z.B. NaCl oder LiCl erhöht werden kann. Doch auch hier reagiert KdpD auf die Zugabe von KCl und reduziert die Aktivität, auch nach Zugabe von 100 mM NaCl oder LiCl. Das System reagiert also immer noch auf die Änderungen der K^+ -Konzentration im Medium (s. Tab. 11).

KdpD und KdpD-C, als funktionstüchtiger K^+ -Sensor, wurden bei unterschiedlichen osmotische Bedingungen in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Doch auch hier wurde auch nach 6 Stunden keine erwähnenswerte Reaktion sowohl von KdpD als auch von KdpD-C beobachtet (s. Abb. 38, S. 86).

4.6 Signaltransduktion von KdpD

Wenn für das K^+ -Sensing nur die cytoplasmatische C-terminale Domäne von KdpD essentiell ist, wie funktioniert dann die Reizwahrnehmung? Auf der einen Seite wird diskutiert, dass die interne K^+ -Konzentration die Aktivität von KdpD reguliert (Frymier *et al.*, 1997; Jung und Altendorf, 2002), andererseits gibt es Untersuchungen, bei denen nur die externe K^+ -Konzentration für die Regulation von KdpD verantwortlich ist (Asha und Gowrishankar, 1993; Roe *et al.*, 2000). Auch die hier durchgeführten Untersuchungen sprechen eher für das Modell, bei dem die externe K^+ -Konzentration die Aktivität von KdpD reguliert. Bei der Erhöhung des osmotische Drucks reagiert die Zelle mit der Akkumulierung von Kaliumionen in Zellinneren (Csonka 1989; Csonka und Hanson, 1991). Trotzdem kann KdpD unter diesen Bedingungen durch eine K^+ -Limitierung im Medium aktiviert werden. Wird die KCl-Konzentration im Medium erhöht, schaltet das System ab (s. Tab. 11). Wäre die interne K^+ -Konzentration ausschlaggebend, würde das System nach einem osmotische Schock und der damit verbundenen internen Anreicherung von K^+ , sofort die Aktivität zumindest reduzieren. Dies wurde jedoch nicht beobachtet.

Wie gelangt aber das externe Signal der Änderung der K^+ -Konzentration zu der an der Membran angelagerten, cytoplasmatischen C-terminalen Domäne (C499-894)? Bisher wurde angenommen, dass der Reiz über die „Input“-Domäne von KdpD wahrgenommen wird. Neben der N-terminalen Domäne sollten die 4 transmembranen Helices und die ersten 200 Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne benötigt werden (Zimmann *et al.*, 1995). Allerdings reagiert C499-894 nachweislich auf die Änderungen der K^+ -Konzentration im Medium (s. Abb. 52, S. 111), obwohl die N-terminale Domäne und alle 4 transmembranen Helices deletiert worden waren. Eine KdpD-Mutante von Puppe *et al.* (1996), bei der die Aminosäuren 392 bis 530 deletiert wurden, zeigte dagegen keine Aktivität. Doch ein sehr ähnliches KdpD-Konstrukt von Heermann *et al.* (2003a), bei dem ebenfalls die 4

transmembranen Helices deletiert worden waren, war aktiv. Der Unterschied waren 32 Aminosäuren (Aminosäure 499 bis 530) der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne, die ein positiv geladenes Aminosäure-Cluster darstellen. Auch Jung und Altendorf (1998b) zeigten, dass dieses Aminosäure-Cluster einen Einfluss auf die Funktion von KdpD hat. Dies könnte auch erklären, warum die stark verkürzte KdpD-Mutante C499-894, die ja dieses Aminosäure-Cluster noch beinhaltet, eine regulierbare Aktivität zeigt. Dennoch muss das Signal, das durch die Änderung der K^+ -Konzentration im Medium ausgelöst wird, über die Membran hinweg wahrgenommen werden. Dabei könnte z.B. ein weiteres bisher unbekanntes Protein beteiligt sein.

Die Gene der verschiedenen Kdp-Systeme sind in der Bakterienwelt weit verbreitet (Walderhaug *et al.*, 1989). Die in der verschiedenen Organismen vorkommenden KdpD-Homologen unterscheiden sich strukturell, wodurch sie wahrscheinlich auch funktionell unterschiedlich reagieren. Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung wurden z.B. *kdp*-Homologe bei *Anabaena* und in dem Genom von *Synechocystis* gefunden (Kaneko *et al.*, 1996). Bei *Anabena* sp. L31 wurden zwei *kdp* Operone entdeckt, *kdp1* und *kdp2*. In diesem Stamm ist das *kdpD*-Gen verkürzt und die Sequenz für die Transmembrandomänen und die C-terminalen Domäne fehlt komplett. Auch scheint es, dass das *kdpE* nicht vorhanden ist. Die Rolle des verkürzten KdpD ist aber immer noch unklar (Ballal *et al.*, 2005). Dies wirft Fragen zur Expression und Regulation des Kdp-Systems in den Cyanobakterien auf. Alahari und Mitarbeiter entdeckten bei Ihren Untersuchungen, dass die Expression der *Anabaena* Kdp-ATPase eine physiologische Regulation durch die externe K^+ -Konzentration zeigt, eine signifikante Beeinflussung durch einen osmotischen Schock aber nicht zu beobachten ist (Alahari *et al.*, 2001).

Um mehr über die Funktionsweise dieses stark verkürzten *Anabaena* KdpD zu erfahren, wurde aus dem *kdpD*-Gen des Cyanobakteriums *Anabaena* und dem *kdpD*-Gen von *E. coli* ein chimäres *kdpD*-Gen konstruiert. Dabei wurde die ersten 365 Aminosäuren des *E. coli* *kdpD*-Gens durch das *Anabaena* *kdpD*-Gen ersetzt und in *E. coli* exprimiert. Das chimäre KdpD reagiert auf die K^+ -Limitierung und auf osmotische Veränderungen und war in der Lage mit KdpE zu interagieren. Dies führte zu der Vermutung, dass das *Anabaena* KdpD mit einer bisher unbekanntem, membrangebundenen Sensorkinase interagieren könnte um die *kdp* Expression zu

regulieren (Ballal *et al.*, 2002). Bisher wurde der unbekannte Bindungspartner jedoch nicht entdeckt.

Das KdpD-Protein von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ist dem *E. coli* KdpD strukturell sehr ähnlich. Das 860 Aminosäuren lange KdpD hat wie das *E. coli* KdpD vier Transmembrandurchgänge und sehr lange cytoplasmatische Domänen (s. Abb. 53). Auch hier wurde in der cytoplasmatischen N-terminalen Domäne das Walker A und B Motiv identifiziert und die Phosphorylierungsstelle in der cytoplasmatischen C-terminalen Domäne (His642) nachgewiesen. Wie das *E. coli* KdpD wird es durch eine Limitierung der K^+ -Konzentration im Medium aktiviert (Steyn *et al.*, 2003).

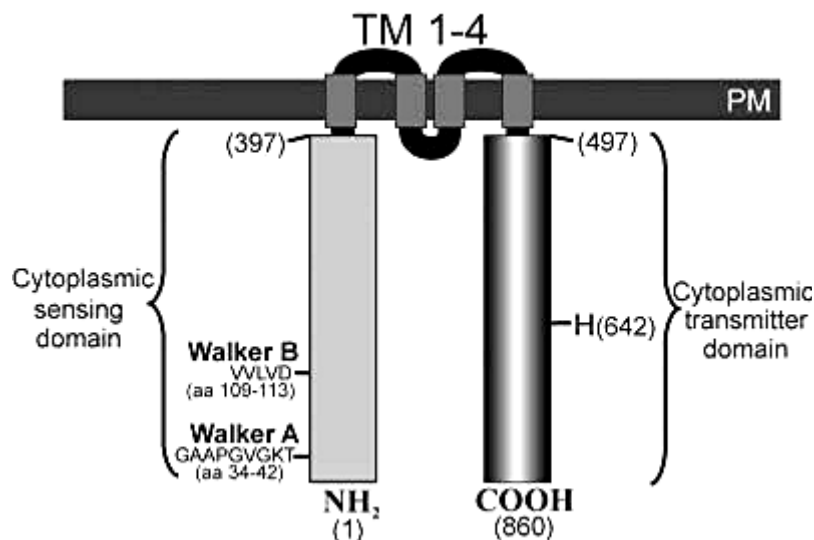


Abb. 53
Schematische Darstellung des KdpD vom *M. tuberculosis* H37Rv. Die funktionellen Bereiche wurden gekennzeichnet (nach Steyn *et al.*, 2003).

Steyn und Mitarbeiter konnten mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid-Systems die Protein-Protein Interaktionen des *M. tuberculosis* KdpD untersuchen. Dabei stellten sie fest, dass die N-terminale Domäne mit den Membranproteinen LprF und LprJ interagiert. Weitere Untersuchungen zeigten, dass KdpD mit LprF und LprJ ein tertiären Komplex bildet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Modell entwickelt, bei dem LprF und LprJ als eine Art zusätzlicher Adapter oder Ligand direkt mit der cytoplasmatischen N-terminalen Domäne interagiert um die Genexpression, die unter der Kontrolle von KdpE steht, zu modulieren (s. Abb. 54; Steyn *et al.*, 2003).

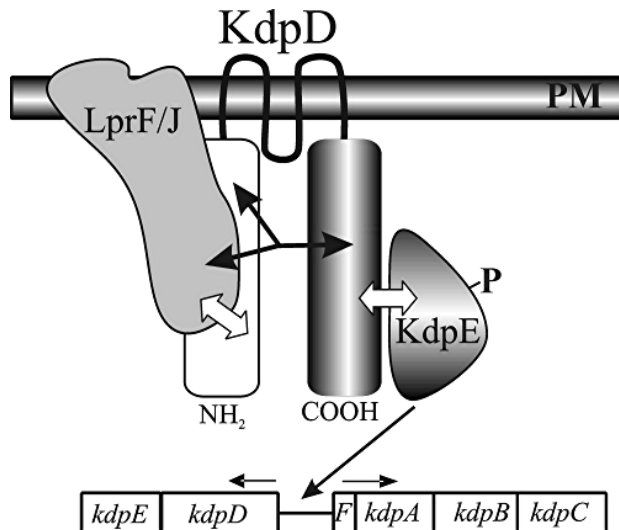


Abb. 54
Modell der Signaltransduktion des KdpD vom *M. tuberculosis*, dass mit den Membranproteinen LprF und LprJ einen Komplex bildet und somit die Genexpression beeinflussen kann (nach Steyn *et al.*, 2003).

Solch eine Interaktion mit einem Membranprotein wäre auch bei der Signaltransduktion von KdpD, bzw. C499-894, vorstellbar. Jedoch wurde bisher kein Homolog zu LprF oder LprJ in *E. coli* gefunden.

Bei der Reinigung von KdpD und KdpD-C mit Hilfe eines fusionierten His-Tags wurden bei den Elutionsfraktionen immer wieder zwei zusätzliche Proteine von ca. 30 und 66 kDa entdeckt. Da die bisherigen Untersuchungen gezeigt haben, dass KdpD-C immer noch die wichtigen Eigenschaften des K^+ -Sensing besitzt, wurden die coeluierten Banden der beiden Reinigungen miteinander verglichen. In beiden Reinigungen waren die gleichen 2 Proteinbanden sichtbar, die nicht mit dem KdpD-Antikörper reagierten (s. Abb. 44, S. 97).

Diese zwei Proteine waren auch in den mit Hilfe der Blue-Native-Methode gefundenen Komplexen vorhanden. Der ca. 440 kDa großen Komplex wurde über eine zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese in seine Bestandteile aufgeteilt. Auch hier wurde ein ca. 30 und ein ca. 66 kDa großes Protein entdeckt, die beide nicht mit dem KdpD-Antikörper reagierten (s. Abb. 47, S. 102).

Diese zwei Proteinbanden bei ca. 30 und 66 kDa wurden massenspektrometrisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei dem ca. 30 kDa großen Protein um die Cytochromoxidase A (CyoA) handelte und bei dem ca. 66 kDa großen Protein um die Glucosamin-6-phosphat-Synthase (GlmS).

Die Cytochromoxidase (bei *E. coli* auch als Ubichinonoxidase QO bezeichnet) ist ein integrales Membranprotein, das die entscheidende Reaktion der Atmungskette katalysiert (Babcock und Wikström, 1992). Die meisten bakteriellen Cytochromoxidasen bestehen aus 3 Untereinheiten (Kroneck *et al.*, 1988; Antholine *et al.*, 1992). Die Funktion der Untereinheit III, die in der Membran neben der Untereinheit I lokalisiert ist, ist noch unklar. Die Untereinheit II der QO von *E. coli* wird als Cytochromoxidase A (CyoA) bezeichnet und beinhaltet die Cu^{++} -A-Bindestelle (Van der Oost *et al.*, 1992).

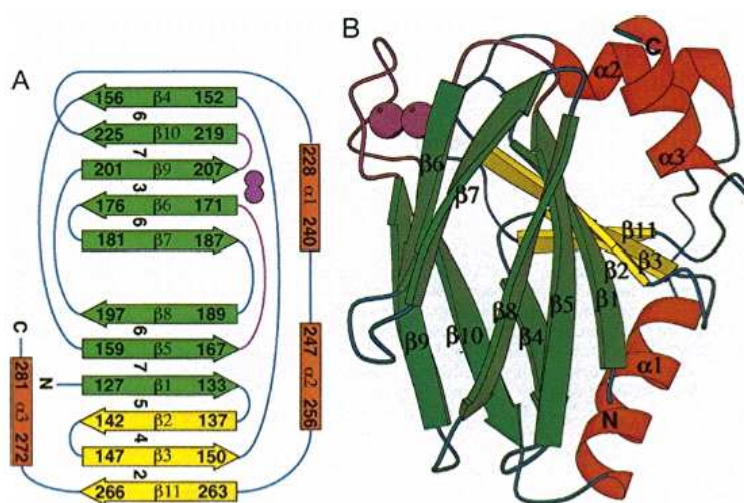


Abb. 55
Oben: Dreidimensionale Struktur von CyoA. (A) Topologie Diagramm zeigt die Faltung (Sekundärstruktur) von CyoA. Das binukleare Kupferzentrum ist als zwei Kugeln dargestellt. (B) Struktur des purple-CyoA (nach Wilmanns *et al.*, 1995).
Unten: Aminosäuresequenz des CyoA

Aminosäuresequenz CyoA (vom 3'- zum 5'-Ende):

```
MRLRKYNKSLGWLSLFAAGTVLLSGCNSALLDPKGGQIGLEQRSLILTAFLMLIVVIPAILM
AVGFAWKYRASNKDAKYSFNWSHSNKVEAVVWTVPIIIIFLAVLTWKTTHALEPSKPLA
HDEKPITIEVVSMDWKWFFIYPEQGIATVNEIAFPANTPVYFKVTSNSVMNSFFIPRLGS
QIYAMAGMQTRLHLIANEPGTYDGISASYSGGPGFSGMKFKAIATPDRAAFDQWVAKAK
QSPNTMSDMAAFEKLAAPSEYNQVEYFSNVKPDFADVINKFMAHGKSMDMTQPEGE
HSAHEGMEGMDSHAESAHS
```

Bei dem Vergleich der Reinigungen von KdpD und KdpD-C mit dem Kontrollstamm, taucht das Protein CyoA nicht auf (s. Abb. 45, S. 98). Es ist bekannt, dass einige Komponenten der Cytochromoxidase anscheinend mit den Untereinheiten des Dinitrifikationswegs in Kontakt stehen (Castresana *et al.*, 1994; Castresana und Saraste, 1995). Dies zeigt, dass CyoA einen Einfluss auf andere Transportmechanismen in *E. coli* haben könnte. Es wäre also auch möglich, dass

CyoA mit KdpD interagiert. Auf der anderen Seite könnte auch die histidinreiche C-terminale Sequenz dafür verantwortlich sein, dass es an die Säule gebunden hat (s. Abb. 55). Dann müsste das Protein jedoch auch in den Reinigungsfractionen des Kontrollstamms zu sehen sein (s. Abb. 45, S. 98). Um eine Interaktion von CyoA mit KdpD nachzuweisen oder auszuschließen müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Das zweite Protein, das bei den Untersuchungen identifiziert wurde ist die Glucosamin-6-phosphat-Synthase (GlmS) oder Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase (GFAT). Die *de novo*-Biosynthese von UDP-GlcNAc zweigt bei Fructose-6-Phosphat von der Glycolyse ab. Katalysiert durch entsprechende Enzyme wird aus Fructose-6-Phosphat in vier Schritten UDP-GlcNAc gebildet. Das Schlüsselenzym für die Murein und LPS-Synthese (UDP-GlcNAc-Biosynthese) ist die Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase. Sie katalysiert die Aminierung von Fructose-6-Phosphat am C-2 und sorgt so für die Abzweigung des Aminosuckerstoffwechsels von der Glycolyse. Das tetramere Enzym ist ein komplex reguliertes Enzym, das durch UDP-GlcNAc, Glucose-6-Phosphat und Glucosamin-6-Phosphat inhibiert wird (Tourian *et al.*, 1983; Broschat *et al.*, 2002).

Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Reinigungsergebnisse aus verschiedenen Medien wurden die Fraktionen von KdpD-C-His₆, KdpD-His₁₀ und als Kontrolle mit *E. coli* HJM verglichen (s. Abb. 45, S. 98). Dabei konnten die coeluierten Banden miteinander verglichen werden, da mit dem Kontrollstamm die gleiche Reinigungsprozedur durchgeführt wurde. Es zeigte sich, dass auch bei der Kontrolle eine schwache Proteinbande bei 66 kDa zu sehen war. Aus diesem Grund ist es eher unwahrscheinlich, dass die Glucosamin-6-phosphat-Synthase (GlmS) auf Grund der Interaktion mit KdpD mitgereinigt wurde. Um jedoch eine genaue Aussage zu treffen, müssen auch hier erst noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das hochaffine K^+ -Transportsystem KdpFABC ist eines der Aufnahmesysteme, das in *Escherichia coli* K^+ akkumuliert. Die Expression des *kdpFABC* Operons steht unter der Kontrolle der regulatorischen Proteine KdpD und KdpE, die ein typisches Sensorkinase/Antwortregulator-System darstellen. KdpD ist ein integrales Protein in der cytoplasmatischen Membran. Der N-terminalen cytoplasmatischen Domäne und den transmembranen Helices von KdpD wurden bisher die Funktion des Signal-“inputs“ zugeschrieben. Überraschend war daher der Befund, dass eine Komplettdelation der N-terminalen Domäne und der ersten beiden Helices (KdpD-C) ein voll funktionsfähigen Sensor darstellt, der auf Änderungen der K^+ -Konzentration im Medium reagiert. Es wurden sodann weitere Teile von KdpD-C deletiert, um den Bereich in KdpD genau zu definieren, der für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Die Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass das KdpD-Konstrukt C499-894, das nur noch aus der cytoplasmatischen, löslichen Domäne besteht, in der Lage ist eine Erhöhung der K^+ -Konzentration im Medium zu registrieren und mit einer Reduzierung der Aktivität reagiert. Der minimale Sensor differenziert zwischen Li^+ , Rb^+ und K^+ Ionen, ebenso wie der Wildtyp. Ein Plasmid, das für den minimalen Sensor codiert, erlaubt einem *kdpD*-Deletionsstamm das Wachstum unter Kalium limitierten Bedingungen im Medien.

Vermutlich ist das Signal, das von KdpD wahrgenommen wird, im Periplasma. Aber wie wird das Signal zu der cytoplasmatische C-terminalen Domäne, die bei der Regulierung der Aktivität involviert ist, übertragen? Eventuell ist KdpD ist nicht der direkte Sensor und bekommt die Änderungen in der K^+ -Konzentration von einem weiteren Protein in der Membran übermittelt. Weitere Untersuchungen zur Membranlokalisierung mit der Natrium-Carbonat-Methode haben gezeigt, dass C499-894 hauptsächlich im Überstand, das heißt in der löslichen Form vorkommt. Dies schließt nicht aus, dass C499-894 sich nicht an die Membran anlagert und so eventuell mit einem unbekanntem Protein interagiert. Bei der Suche nach diesem unbekanntem Protein wurden zwei eventuelle Kandidaten ermittelt, die Cytochromoxidase A (CyoA) und die Glucosamin-6-phosphat-Synthase (GlmS). Ob diese Proteine wirklich mit KdpD interagieren muss noch nachgewiesen werden.

5. SUMMARY

The high affinity K^+ transport system KdpFABC is one of several uptake systems that accumulate K^+ in *Escherichia coli*. Expression of the *kdpFABC* operon is under control of the regulatory proteins KdpD and KdpE, which constitute a typical sensor kinase/response regulator system. KdpD is an integral protein of the cytoplasmic membrane. The N-terminal domain, the 4 helices and 200 amino acids of the cytoplasmic C-terminal domain are accredited to be involved in the signal input function. Surprisingly, a mutant (KdpD-C) lacking the N-terminal domain, helix 1 and 2 is a functional K^+ sensor, which is able to detect the changes in K^+ concentration in the medium. To investigate which parts of the KdpD protein are essential for signal transduction, various truncated KdpD variants were constructed and analyzed. The results show that the fragment C499-894, which contains only the cytoplasmic C-terminal domain of KdpD, is able to recognise the increase in K^+ concentration in medium and reduce the level of activity. This mini sensor is also able to discriminate between Li^+ , Rb^+ and K^+ ions like the wild-type KdpD. A plasmid coding for this mini sensor allows a *kdpD* deletion strain to grow under K^+ -limited conditions in medium.

Presumably, the signal perceived by KdpD is in the periplasm, but how is the signal transmitted to the cytoplasmic domain of KdpD that controls activity? Perhaps KdpD is not the direct sensor, an additional component in the membrane might sense the signal and communicate with KdpD. Further research with sodium carbonate extraction to determine the membrane localisation of C499-894 showed the protein mainly found in the supernatant, suggesting C499-894 is a soluble protein, although C499-894 could be attached to the membrane to come in contact with an unknown membrane protein. Looking for the unknown component two protein candidates were found by co-purification, the cytochrome oxidase A (CyoA) and the glucosamine-6-phosphate synthase (GlmS). To find an interaction between these proteins and KdpD more research has to be done.

6. LITERATUR

- Ahnert F, Schmid R, Altendorf K, und Greie JC (2006). „ATP binding properties of the soluble part of the KdpC subunit from the *Escherichia coli* K(+)-transporting KdpFABC P-type ATPase”. *Biochemistry* 12; 45: 11038-11046.
- Alahari A, Ballal A, und Apte SK (2001). „Regulation of Potassium-Dependent Kdp-ATPase Expression in the Nitrogen-Fixing Cyanobacterium *Anabaena torulosa*.” *J Bacteriol* 183: 5778-5781.
- Altendorf K, Siebers A, und Epstein W (1992). „The Kdp ATPase of *Escherichia coli*”. *Ann NY Aca Sci* 671: 228-243.
- Altendorf K, Voelkner P, und Puppe W (1994). „The sensor kinase KdpD and the response regulator KdpE control expression of the kdpFABC operon in *Escherichia coli*”. *Res Microbiol* 145: 374-381.
- Altendorf K, und Epstein W (1996). „The Kdp-ATPase of *Escherichia coli*”. *Biomembranes* 5: 403-420.
- Altendorf K, Gaßel M, Puppe W, Möllenkamp T, Zeeck A, Boddien C, Fendler K, Bamberg E, und Drose S (1998). „Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*”. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 163: 137-146.
- Antholine WE, Kastrau DHW, Steffens GCM, Buse G, Zumft WG, und Kroneck PHM (1992). „A comparative EPR investigation of the multicopper proteins nitrous oxide reductase and cytochrome c oxidase”. *Eur J Biochem* 209: 875-881.
- Asha H, und Gowrishankar J (1993). „Regulation of *kdp* operon expression in *Escherichia coli*: evidence against turgor as signal for transcriptional control”. *J. Bacteriol* 175: 4528-4537.
- Babcock GT, und Wikström M (1992). „Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration”. *Nature* 356: 301-309.
- Ballal A, Heermann R, Jung K, Gassel M, Apte K, und Altendorf K (2002). „A chimeric *Anabena/Escherichia coli* KdpD protein (Anacoli KdpD) functionally interacts with *E. coli* KdpE and activates *kdp* expression in *E. coli*”. *Arch Microbiol* 178: 141-148.
- Ballal A, bramkamp M, Rajaram H, Zimmann P, Apte SK, und Altendorf K (2005). „An atypical KdpD homologue from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31: cloning, in vivo expression, and interaction with *Escherichia coli* KdpD-CTD”. *J Bacteriol* 187: 4921-4927.

- Betrand J, Altendorf K, und Bramkamp M (2004). „Amino acid substitutions in putative selectivity filter regions III and IV in KdpA alter ion selectivity of the KdpFABC complex from *Escherichia coli*“. J Bacteriol 186: 5516-5522.
- Booth IR (1985). „Regulation of cytoplasmic pH in bacteria“. Microbiol. Rev. 49: 359-378.
- Bramkamp M, und Altendorf K (2004). „Functional modules of KdpB, the katalytic subunit of the Kdp-ATPase from *Escherichia coli*“. Biochemistry 28: 12289-12296.
- Brandon L, Dorus S, Epstein W, Altendorf K, und Jung K (2000). „Modulation of KdpD phosphatase implicated in the physiological expression of the *kdp* ATPase of *Escherichia coli*“. Mol Microbiol 38: 1086-1092.
- Broschat KO, Gorka C, Kasten TP, Gulve EA, und Kilpatrick B (2002). „A radiometric assay for glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase“. Anal Biochem 305: 10-15.
- Bullock WO, Fernandez JM, und Short JM (1987). „XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase section“. Biotechniques 5: 376-378.
- Buurman ET, Kim KT, und Epstein W (1995). „Genetic evidence for two sequentially occupied K⁺ binding sites in the Kdp transport ATPase“. J. Biol. Chem. 270: 6678-6685.
- Casadaban MJ, Chou J, und Cohen SN (1980). „In vitro gene fusions that join an enzymatically active beta-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals“. J Bacteriol 143: 971-980.
- Castresana J, Lübben M, Saraste M, und Higgins DG (1994). „Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen“. EMBO J 13: 2516-2525.
- Castresana J, und Saraste M (1995). „Evolution of energetic metabolism: the early respiration hypothesis“. Trends Biol Sci 20: 443-447.
- Csonka LN (1989). „Physiological and genetic response of bacteria to osmotic stress“. Microbiol Rev 55: 121-147.
- Csonka LN, und Hanson AD (1991). „Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology“. Annu Rev Microbiol 45: 569-606.
- Davis NG, und Model P (1985). „An artificial anchor domain: hydrophobicity suffices to stop transfer.“ Cell 41: 607-614.

- Dinnbier U, Limpinsel E, Schmid R und Bakker EP (1988). „Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations”. Arch Microbiol 150: 348-357.
- Dorus S, Mimura H, und Epstein W (2001). „Substrate-binding clusters of the K⁺-transporting Kdp ATPase of *Escherichia coli* investigated by amber suppression scanning mutagenesis”. J Biol Chem 276: 9590-9598.
- Epstein W, und Schultz SG (1965). „Cation transport in *Escherichia coli*. V. Regulation of cation content“. J Gen Physiol 49: 221-234.
- Epstein W, und Kim BS (1971). „Potassium Transport Loci in *Escherichia coli* K-12”. J Bacteriol 108: 639-644.
- Epstein W, und Davis M (1970). „Potassium-dependent mutants of *Escherichia coli* K-12”. J Bacteriol 101: 836-843.
- Epstein W, Whitelaw V, und Hesse J (1978). „A K⁺ transport ATPase in *Escherichia coli*”. J Biol Chem 253: 6666-6668.
- Epstein W (1985). „The Kdp system: A bacterial K⁺-transport ATPase”. Curr Top Membr Transp 23: 153-175.
- Epstein W (1986). „Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*”. FEMS Microbiol Rev 39: 73-78.
- Epstein W (2003). „The roles and regulation of potassium in bacteria“. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 75: 293-320.
- Farabaugh PJ (1978). „Sequence of the *lac I* gene”. Nature 274: 765-769.
- Facey SJ, und Kuhn A (2003). „The sensor protein KdpD inserts into *Escherichia coli* membrane independent of the Sec translocase and YidC“. Eur J Biochem 270: 1724-1734.
- Facey S, und Kuhn A (2004). „Membran integration of *E. coli* model membran proteins”. Biochim Biophys Acta 1694: 55-66.
- Fink K (2004) Diplomarbeit: „Rekonstitution von KdpD-C aus *Escherichia coli* in Liposomen und YidC-Proteoliposomen“. Universität Hohenheim, Institut für Mikro- und Molekularbiologie, Professor A. Kuhn.
- Frymier JS, Reed TD, Fletcher SA, und Csonka LN (1997). „Characterization of transcriptional regulation of the *kdp* operon of *Salmonella typhimurium*”. J Bacteriol 179: 3061-3063.
- Galinski EA (1995). „Osmoadaptation in bacteria”. Adv Microb Physiol 37: 272-328.

- Gaßel M (1994). „Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Funktionalität der KdpC-Untereinheit des Kalium transportierenden Kdp-Systems aus *E. coli*“. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- Gaßel M, Möllenkamp T, Puppe W, und Altendorf K (1999). „The KdpF subunit is part of the K⁺-translocating Kdp complex of *Escherichia coli* and is responsible for stabilization of the complex *in vitro*“. J Biol Chem 274: 37901-37907.
- Gaßel M, und Altendorf K (2001). „Analysis of KdpC of the K⁺-transporting KdpFABC complex of *Escherichia coli*“. Eur. J. Biochem. 268: 1772-1782.
- Giaever HM, Styrvold OB, Kaasen I, und Strom AR (1988). „Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*“. J Bacteriol 170: 2841-2849.
- Guzman LM, Belin D, Carson HJ, und Beckwith J (1995). „Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promotor“. Journal of Bacteriology 177: 4121-4130.
- Harold FM, and Altendorf K (1974). „Cation transport in bacteria: K⁺, Na⁺, and H⁺“. Curr Top Membr Transp 5: 1-50.
- Haupt M, Bramkamp M, Coles M, Altendorf K, und Kessler H (2004). „Inter-domain motions of the N-domain of the KdpFABC complex, a P-type ATPase, are not driven by ATP-induced conformational changes“. J Mol Biol 342: 1547-1558.
- Heermann R, Altendorf K, und Jung K (1998). „The turgor sensor KdpD of *Escherichia coli* is a Homodimer“. Biochim Biophys Acta 1415: 114-124.
- Heermann R, Altendorf K, und Jung K (2000). „The hydrophobic N-terminal domain complements the membrane-anchored C-terminal domain of the kinase KdpD of *Escherichia coli*“. J Biol Chem. 275: 17080-17085.
- Heermann R, Fohrmann A, Altendorf K, und Jung K (2003a). „The transmembrane domains of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* are not essential for sensing K⁺ limitation“. Mol Microbiol 47: 839-848.
- Heermann R, Altendorf K, und Jung K (2003b). „The N-terminal input domain of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* stabilizes the interaction between the cognate response regulator KdpE and the corresponding DNA-binding site“. J Biol Chem 278: 51277-51284.
- Heginbotham L, Kolmakova-Partensky L, und Miller C (1998). „Functional reconstitution of a prokaryotic K⁺ channel“. J Gen Physiol 111: 741-749.

- Helmer GL, Laimins LA, und Epstein W (1982). „Mechanisms of potassium transport in bacteria”. *Membr Transp* 2: 123-128.
- Hesse JE, Wieczorek L, Altendorf K, Reicin AS, Dorus E, und Epstein W (1984). „Sequence homology between two membrane transport ATPases, the Kdp-ATPase of *Escherichia coli* and the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum”. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4746-4750.
- Huder JB, und Dimroth P (1993). „Sequence of the sodium ion pump methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella parvula*”. *J Biol Chem* 268: 24564-24571.
- Jung K, Tjaden B, und Altendorf K (1997). „Purification, Reconstitution, and Characterization of KdpD, the Turgor Sensor of *Escherichia coli*”. *J Biol Chem* 272: 10847-10852.
- Jung K, Heermann R, Meyer M, und Altendorf K (1998). „Effect of cystein replacement on the properties of the turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*”. *Biochim Biophys Acta* 1372: 311-322.
- Jung K, und Altendorf K (1998a). „Truncation of amino acids 12 to 128 causes deregulation of the phosphatase activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*”. *J Biol Chem* 273: 17406-17410.
- Jung K, und Altendorf K (1998b). „Individual substitution of clustered arginine residues of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* modulate the ratio of kinase to phosphatase activity“. *J Biol Chem* 273: 26415-20.
- Jung K, Veen M, und Altendorf K (2000). „K⁺ and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*“. *J Biol Chem* 275: 40142-40147.
- Jung K, Krabusch M, und Altendorf K (2001). „Cs(+) induces the *kdp* operon of *Escherichia coli* by lowering the intracellular K(+) concentration“. *J Bacteriol* 183: 3800-3803.
- Jung K, und Altendorf K (2002). „Towards an understanding of the molecular mechanisms of stimulus perception and signal transduction by the KdpD/KdpE system of *Escherichia coli*“. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 223-228.
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirose M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, und Tabata S (1996). „Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II.

- Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement)". *DNA Res.* 3: 185-209.
- Knaysi G (1951). „Elements of bacterial cytology". 2nd ed., Cornell University Press (Comstock), Ithaca, N.Y.
- Kroneck PMH, Antholine WAS, Riester J, und Zumft WG (1988). „The cupric site in nitrous oxide reductase contains a mixed-valence [Cu(II),Cu(I)] binuclear centre: a multifrequency electron paramagnetic resonance investigation". *FEBS Letters* 242: 70-74.
- Laimins LA, Rhoads DB, Altendorf K, Epstein W (1978). „Identification of the structural proteins of an ATP-driven potassium transport system in *Escherichia coli*". *Proc Natl Acad Sci* 75: 3216-3219.
- Laimins LA, Rhoads DB, und Epstein W (1981). „Osmotic control of *kdp* operon expression in *Escherichia coli*". *Proc Natl Acad Sci* 78: 464-468.
- Larsen PI, Sydnes LK, Landfald B und Strom AR (1987). „Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose". *Arch Microbiol* 147:1-7.
- Lukat GS, Lee BH, Mottonen JM, Stock AM, und Stock JB (1991). „Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis". *J Biol Chem* 266: 8348-8354.
- Malli R, und Epstein W (1998). „Expression of the Kdp ATPase is consistent with regulation by turgor pressure". *J Bacteriol* 180: 5102-5108.
- Miller JH (1972). „Experiments in molecular genetics". Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Miroux B, und Walker JE (1996). „Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels". *J Mol Biol* 60: 289-98.
- Nakashima K, Sugiura A, und Mizuno T (1993). „Functional reconstitution of the putative *Escherichia coli* osmosensor, KdpD, into liposomes". *J Biochem* 114: 615-621.
- Parkinson JS, und Kofoed EC (1992). „Communication modules in bacterial signaling proteins". *Annu Rev Genet* 26: 71-112.
- Puppe W, Siebers A, Altendorf K (1992). „The phosphorylation site of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis of the aspartatic acid residues 300 and 307 of the KdpB subunit". *Mol Microbiol* 6: 3511-3520.

- Puppe W, Zimmann P, Jung K, Lucassen M, Altendorf K (1996). „Characterization of truncated forms of the KdpD protein, the sensor kinase of the K⁺-translocating Kdp system of *Escherichia coli*“. J Biol Chem 271: 25027-25034.
- Polarek JW, Williams G, Epstein W (1992). „The products of the kdpDE operon are required for expression of the Kdp ATPase of *Escherichia coli*“. J Bacteriol 174: 2145-2151.
- Potts M (1994). „Desiccation tolerance of prokaryotes“. Microbiol Rev 58: 755-805.
- Rampersaud A, Harlocker SL, und Inouye M. (1994). „The OmpR protein of *Escherichia coli* binds two sites in the *ompF* promoter region in a hierarchical manner determined by its degree of phosphorylation“. J Biol Chem 269: 12559-12566.
- Record MT Jr, Courtenay ES, Cayley DS und Guttman HJ (1998). „Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water“. Trends Biochem Sci 23: 143-148.
- Rhoads DB, Waters FB, Epstein W (1976). „Cation transport in *Escherichia coli* VIII. Potassium transport mutants“. J Gen Physiol 67: 325-341.
- Rhoads DB, und Epstein W (1977). „Energy coupling to net K⁺ transport in *Escherichia coli* K-12“. J Biol Chem 252: 1394-1401.
- Roe AJ, McLaggan D, O'Byrne CP, und Booth IR (2000). „Rapid inactivation of the *Escherichia coli* Kdp K⁺ uptake system by high potassium concentrations“. Mol Microbiol 35: 1235-1243.
- Rothenbücher MC (2000) Diplomarbeit: „Untersuchung der Funktionalität von Fragmenten des Osmosensors KdpD von *Escherichia coli*.“ Universität Hohenheim, Institut für Mikro- und Molekularbiologie, Professor A. Kuhn.
- Rothenbücher MC, Facey SJ, Kiefer D, Kossmann M, und Kuhn A (2006). „The Cytoplasmic C-Terminal Domain of the *Escherichia coli* KdpD Protein Functions as a K⁺ Sensor“. J Bacteriol 188: 1950-1958.
- Schägger H, Cramer WA, und van Jagow G (1994). „Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis“. Anal Biochem 217: 220-230.
- Schägger H, und von Jagow G (1991). „Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form“. Anal Biochem 199: 223-31.

- Sambrook J, Fritsch FE, und Maniatis T (1989). „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F, Nicklen S, und Coulson AR (1977). „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors“. Proc Natl Acad Sci 74: 5463-54637.
- Sanger F, Nicklen S, Cloulson AR (1977). „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors“. Proc Natl Acad Sci 74: 5463-5467.
- Sardesai AA, und Gowrishankar J (2001). „Improvement in K⁺-limited growth rate associated with expression of the N-terminal fragment of one subunit (KdpA) of the multisubunit Kdp transporter in *Escherichia coli*“. J Bacteriol 183: 3515-3520.
- Sardesai AA, und Gowrishankar J (2002). „*trans*-acting mutations in loci other than *kdpDE* that effect *kdp* operon regulation in *Escherichia coli*: effects of cytoplasmic thiol oxidation status and nucleoid protein nH-NS on *kdp* expression“. J Bacteriol 183: 86-93.
- Savouré A, Hua XJ, Bertauche N, Van Montagu M, und Verbruggen N (1997). „Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*“. Mol Gen Genet 254:104-109.
- Serrano R (1988). „Structure and function of protein translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi“. Biochim Biophys Acta 947: 1-28.
- Siebers A (1988). „Kalium-Transport bei *Escherichia coli*: Funktionelle, immunologische und topographische Untersuchungen der Kdp-ATPase“. Dissertation, Universität Osnabrück.
- Siebers A, und Altendorf K (1989). „Characterization of the phosphorylated intermediate of the K⁺-translocating Kdp-ATPase from *Escherichia coli*“. J Biol Chem 64: 5831-5838.
- Suelter CH (1970). „Enzymes activated by monovalent cations“. Sciences 168: 789-795.
- Sugiura A, Nakashima K, Tanaka K, und Mizuno T (1992). „Clarification of the structural and functional features of the osmoregulated *kdp* operon of *Escherichia coli*“. Mol Microbiol 6: 1769-1776.
- Sugiura A, Hirokawa K, Nakashima K, Mizuno T (1994). „Signal-sensing mechanisms of the putative osmosensor KdpD in *Escherichia coli*“. Mol Microbiol 14: 929-938.

- Sutherland L, Cairney J, Elmore MJ, Booth IR, und Higgins CF (1986). „Osmotic regulation of transcription: induction of the proU betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium”. *J Bacteriol* 168: 805-814.
- Stallkamp I, Altendorf K, und Jung K (2002). „Amino acid replacement in transmembrane domain 1 influence osmosensing but not K⁺ sensing by the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*“. *Arch Microbiol* 178: 525-530.
- Stallkamp I, Dowhan W, Altendorf K, und Jung K (1999). „Negatively charged phospholipids influence the activity of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*“. *Arch Microbiol* 172: 295- 302.
- Steyn AJ, Joseph J, und Bloom BR (2003). „Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lpr family“. *Mol Microbiol* 47: 1075-89.
- Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM (1989). „Protein phosphorylation and regulation of adaptive response in bacteria”. *Microbiol Rev* 53: 450-496.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990). „Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes”. *Meth Enzymol* 185: 60-89.
- Tabor S, und Richardson CC (1985). „A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes”. *Proc Natl Acad Sci* 82: 1074-1078.
- Timasheff SN (1998). „In disperse solution, "osmotic stress" is a restricted case of preferential interactions”. *Proc Natl Acad Sci* 95: 7363-7367.
- Tokishita S, und Mizuno T (1994). „Transmembrane signal transduction by the *Escherichia coli* osmotic sensor EnvZ.: intermolecular complementation of transmembrane signalling“. *Mol Microbiol* 13: 435-444.
- Tourian A, Callahan M, und Hung W (1983). „L-glutamine D-fructose-6-P aminotransferase regulation by glucose-6-P and UDP-N-acetylglucosamine”. *Neurochem Res* 8: 1589-1595.
- Towbin H, Staehelin T, und Gordon J (1979). „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications“. *Proc Natl Acad Sci* 76: 4350-4354.
- van der Laan M, Gassel M, und Altendorf K (2002). „Characterization of amino acid substitutions in KdpA, the K⁺-binding and -translocating subunit of the KdpFABC complex of *Escherichia coli*”. *J Bacteriol* 184: 5491-5494.

- Völkner P (1991). „Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen der Regulationsproteine KdpD und KdpE des Kdp-Systems von *Escherichia coli*“. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- Voelkner P, Puppe W, und Altendorf K (1993). „Characterization of the KdpD protein, the sensor kinase of the K⁺-translocating Kdp system of *Escherichia coli*“. Eur J Biochem 217: 1019-1026.
- Volz K, und Matsumara P (1991). „Crystal structure of *Escherichia coli* CheY refined at 1,7-Å resolution“. J Biol Chem 266: 15511-15519.
- Walderhaug MO, Dosch DC, und Epstein W (1987). „Potassium transport in bacteria. In: Ion transport in prokaryotes“. Rosen, B.P. & Silver, S., eds.; Academic Press, NY, 85-130.
- Walderhaug MO, Litwack DE, und Epstein W (1989). „Wide distribution of homologues of *Escherichia coli* Kdp K⁺-ATPase among gram-negative bacteria“. J Bacteriol 171: 1192-1195.
- Walderhaug MO, Polarek JW, Voelkner P, Daniel JM, Hesse JE, Altendorf K, und Epstein W (1992). „KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* Operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators“. J Bacteriol 174: 2152-2159.
- Wickner W, und Killick T (1977). „Membrane-associated assembly of M13 phage in extracts of virus-infected *Escherichia coli*“. Proc Natl Acad Sci USA 74: 505-509.
- Wilmanns M, Lappalainen P, Kelly M, Sauer-Eriksson E, und Saraste M (1995). „Crystal structure of the membrane-exposed domain from a respiratory quinol oxidase complex with an engineered dinuclear copper center“. Proc Natl Acad Sci 92: 11955-11959.
- Zimmann P, Puppe W, und Altendorf K (1995). „Membrane topology analysis of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*“. J Biol Chem 270: 28282-28288.

7. ANHANG

7.1 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtri-phosphat, z.B. ddATP
dGTP	Desoxyguanidintri-phosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat
dTTP	Desoxythymidinphosphat
D, Da	Dalton
DB	Dilution-Puffer
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSP	Dithiobissuccinimidylpropionat
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKRM	EDTA und KOAc behandelte rauhe ER-Membran

ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et aliter; und andere
EtOH	Ethanol
G	Guanin
g	Gramm
GFP	Green-Fluorescent-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
HCl	Salzsäure/Chlorwasserstoff
H ₂ O bidest.	destilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Kdp	K ⁺ dependent
KOAc	Kaliumacetat
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LSM	Laser Scanning Mikroskop
M	Mol (Mol/l)
mA	Milliampere
MCS	multiple cloning site
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MgOAc	Magnesiumacetat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge/Natriumhydroxid
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
P	Pellet (Niederschlag)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PK	Proteinase K
pmol	picomol
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
psi	pounds per square inch
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Supernatant (Überstand)
s.	siehe
sec	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	SRP-Rezeptor
SRP	Signal-Erkennungs-Partikel
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	„unit“, Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen
µg	Mikrogramm

μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
λ	Wellenlänge Lambda (nm)

7.2 Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

7.3 DNA-Sequenz von KdpD

ATGAATAACGAACCCCTTACGTCCCGACCCCGATCGTCTGCTGGAACAAACTGCCGCGCCGCATCGGGGGAAGCTG
 AAAGTTTTCTTCGGTGCCTGTGCAGGCGTCGGGAAGACCTGGGCGATGCTGGCAGAAGCCCAGCGACTGCGGGCG
 CAAGGGCTGGATATTGTGGTTGGCGTGGTAGAAAACCCACGGGCGAAAAGATACCGCCGCCATGCTGGAAGGGCTG
 GCTGTTCTGCCGTTAAAACGCCAGGCGTACCGTGGGCGGCATATCAGCGAGTTTGTATCTCGATGCCGCCCTCGCC
 CGCCGCCCGGCGCTGATCTTAATGGACGAACTGGCGCACAGTAATGCGCCAGGTTCCCGTCAATCCAAAACGCTGG
 CAGGATATCGAAGAACTGCTGGAAGCTGGCATTGATGTTTTCACTACCGTCAACGTTTACGCATCTGGAAAAGTCTG
 AATGATGTGGTCAGCGGCGTCACCGGAATTCAGGTACGGGAAACCGTGCCCGATCCTTTTTTCGATGCCGCCGAC
 GACGTGGTGTGGTGGACTTGCCCCGGACGATCTGCGCCAGCGGCTGAAAGAAGGCAAAGTCTATATTGCCGGG
 CAGGCGGAGCGGCCATTGAACATTTTTTCCGCAAAGGTAATCTGATCGCCCTGCGCGAACTGGCACTGCGCCGT
 ACTGCCGATCGCGTTGATGAGCAAATGCGCGCCTGGCGGGGGCATCCTGGCGAAGAGAAAAGTGTGGCACACGCGC
 GACGCGATCCTTTTTATGCATCGGCCATAACACCGGCAGCGAAAACCTGGTCCGCGCAGCGGCGCGGCTGGCGTCA
 CGGCTGGGTAGCGTCTGGCACGCGGTGTATGTTGAAACCCCTGCCCTGCACCGCTTACCGGAAAAAAAAACGTCGG
 GCAATTCTCAGCGCCTTACGTCTGGCGCAGGAACTGGGCGCGGAGACGGCAACACTTTCTGATCCAGCGGAAGAG
 AAAGCGGTAGTGCCTTATGCCCGTGAACATAATCTCGGCAAGATTATTCTCGGTCGCCCGCCTCGCGCCGCTGG
 TGGCGTCGGGAAACGTTTTGCTGACCGACTGGCGCGCATCGCCCCGATCTCGATCAGGTGCTGGTCGCGCTTGAT
 GAACCACCCGCCCGCACGATTAACAACGCGCCGGATAACCGCTCTTTTAAAGACAAGTGGCGTGTACAAAATCAG
 GGATGCGTGGTTGCCGCCGCTTATGCGCCGTTATCACCTAATTGCCATGCAGTGGCTGATGGCGTTTGATGCC
 GCCAACCTGGTGATGCTGTATCTGCTTGGCGTGGTGGTGGTGGCGCTATTTTTATGGACGCTGGCCTTCAGTGGTT
 GCCACCGTCATTAATGTAGTGAGTTTTGATCTCTTTTTTATCGCCCCACGCGGCACGCTCGCCGCTCTGATGTG
 CAATATCTGCTGACCTTCGCGGTGATGTTAACCGTCGGGCTGGTGATCGGGAAACCTTACTGCTGGCGTGCCTTAT
 CAGGCGCGGGTAGCCCGTTACCGCGAGCAACGCACACGGCACTTATATGAAATGTGCAAAGCTCTGGCGGTGGGC
 CGCAGTCCGCAGGATATCGCTGCCACCAGCGAACAATTTATTGCCTCCACGTTTCATGCCCGCAGTCAGGTGTTG
 TTGCCCGATGACAACGGTAAATTGCAGCCGTTAACACATCCGCAAGGAATGACGCCGTGGGACGATGCCATCGCG
 CAGTGGAGTTTTGATAAAGGCCTGCCTGCGGGCGCGGGCACCGACACGTTACCCGGTGTACCGTACCAGATTTTTG
 CCGCTAAAAGCGGCGAGAAAACCTACGGGCTGGTGGTGGTGGAGCCGGGGAATCTGCGCCAGTTGATGATCCCG
 GAACAGCAGCGCCTGCTGGAGACGTTTACGCTGTTAGTCGCCAATGCCCTTGAGCGGCTGACGCTAACCGCCAGC
 GAAGAACAGGCGCGGATGGCAAGCGAACGTGAACAGATCCGCAACGCCCTGCTGGCGGCGCTTTCGCATGATTTA
 CGCACGCCGCTTACGGTGTGTTTGGTCAGGCAGAAATCTTAACGCTCGATCTGGCAAGCGAAGGATCACCCAC
 GCCCGCCAGGCCAGCGAGATCCGTCAGCATGTGCTGAACACTACCCGACTGGTGAATAATCTACTGGATATGGCG
 CGAATTCAGTCCGGCGGCTTTAATTTGAAGAAAGAGTGGTTAACGCTGGAAAGAGTAGTCGGCAGCGCGCTGCAA
 ATGCTGGAACCGGTTTTATCGTCGCCCATCAATCTTTCTCTGCCAGAACCCTGACCTTAATCCACGTTGACGGG
 CCACTCTTTGAACGGGTGCTGATTAATCTGCTGGAGAACGCGGTGAAATATGCGGGTGCAGGCGGAAATGGT
 ATCGATGCCACGTTGAGGGCGAAAATCTACAACCTGGATGTCTGGGATAACGGCCCCGGTCTTCCGCCAGGCCAG
 GAGCAGACGATATTTGATAAGTTTTGCTCGCGGGAATAAAGAGTCGGCAGTACCGGGGTAGGGCTTGGACTGGCA
 ATTTGTGCGGCGATAGTGGATGTACACGGGGGCACTATTACCGCGTTCAACCGACCGGAAGGTGGTGCCTGTTTT
 CGTGTTACACTTCCCAGCAAACCTGCCCTGAACTTGAAGAATTTTCATGAGGATATGTGA

LEBENS LAUF

Geboren am

25. Februar 1972

Singen/ HTW

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung/Studium

seit 08/2000

Promotion an der Universität Hohenheim
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

1993 – 07/2000

Diplomstudiengang Biologie an der
Universität Hohenheim

Hauptfach: Physiologie

1. Nebenfach: Mikrobiologie

2. Nebenfach: Membranphysiologie

3. Nebenfach: Biochemie

Thema der Diplomarbeit:

*„Untersuchung der Funktionalität von Fragmenten
des Osmosensorproteins KdpD von Escherichia
coli“ durchgeführt am Institut für Mikrobiologie der
Universität Hohenheim*

Betreuer: Prof. Dr. Andreas Kuhn

1990 – 1992

Wirtschaftsgymnasium, Calw-Wimberg

Abschluss: Abitur

1981 – 1990

Hermann Hesse Gymnasium, Calw

(bis zur 10. Klasse)

1978 – 1981

Grundschule, Calw-Hirsau

Fachbezogene Nebentätigkeit

4/1998 bis 5/2000

Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für
Molekular- und Mikrobiologie der Universität
Hohenheim

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Dipl. Biol. Marina Rothenbücher, Doktorandin am Institut für Mikro- und Molekularbiologie der Universität Hohenheim, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ort, Datum

Unterschrift