

"Charaktiersierung des Formiat-Kanal-Proteins FocA
aus *Escherichia coli* "

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Claudia Doberenz

geb. am: 20.02.1984 in Mittweida

Gutachter /in

1. Prof. G. Sawers
2. Prof. S.-E. Behrens
3. Prof G. Uden

Tag der Verteidigung: 30.01.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	0
1 Einleitung	2
2 Material und Methoden	11
2.1 Organismen und Plasmide	11
2.2 Nährmedien und Zusätze	13
2.2.1 LB-Medium	13
2.2.2 TB-Medium	13
2.2.3 TGYEP-Medium	14
2.2.4 Antibiotika	14
2.3 Zellanzucht	14
2.3.1 Analyse des Bakterienwachstums	14
2.3.2 Aerobe Anzucht	15
2.3.3 Semianaerobe Anzucht	15
2.3.4 Zellernte	16
2.3.5 Stammhaltung	16
2.3.6 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (Griffith & Wolf, 2002)	16
2.4 Molekularbiologische Methoden	17
2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren	17
2.4.2 Auftrennung von Nukleinsäuren	17
2.4.3 Größenstandard	17
2.4.4 Konzentrationsbestimmung von DNA	18
2.4.5 Reinigung von PCR-Produkten	18
2.4.6 Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	18
2.4.7 Verdau von DNA-Fragmenten und Vektoren mit Restriktionsendonukleasen	18
2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten und Mikrodialyse	18
2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	19
2.5.1 Standard PCR	19
2.6 Herstellung und Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> Klone	20
2.6.1 Herstellung elektrokompenter Zellen	20
2.6.2 Transformation durch Elektroporation (Dower <i>et al.</i> , 1988)	20
2.6.3 Herstellung CaCl ₂ ultra-kompenter Zellen	20
2.6.4 Transformation in chemokompetente Zellen	21
2.6.1 <i>Quick Check</i> Gel zur Überprüfung von Transformanten	21
2.6.2 DNA-Sequenzierung und Auswertung	21
2.6.3 Gerichtete Mutagenese	22
2.7 Proteinchemische Methoden	22
2.7.1 Zellaufschluss und Fraktionierung	22
2.7.2 Solubilisierung von Membranen	23
2.7.3 Reinigung von <i>Strep</i> -tag-II Fusionsproteinen	23
2.7.4 Reinigung von Proteinen mit 6 x His-tag	24
2.7.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	24
2.7.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)	24
2.7.5.2 Proteinbestimmung bei 280 nm mit Hilfe des Nanodrops	24

2.7.5.3	Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry <i>et al.</i> , 1951)	25
2.7.6	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.7.7	Blue-Native Elektrophorese	26
2.7.8	Färbung von Proteinen	27
2.7.8.1	Coomassie Färbung (Weber & Osborn, 1969)	27
2.7.8.2	Coomassie Blue Silver Färbung (Kolloidal Färbung)	27
2.7.9	Western-Blot Analyse	28
2.7.10	Proteindetektion mittels ECL-Reaktion (<i>Enhanced Chemiluminescence</i>)	28
2.7.11	Antikörper- <i>Stripping</i> der Nitrocellulosemembran	29
2.7.12	Herstellung und Reinigung von Antikörpern	29
2.7.13	<i>Far-Western</i> Analyse	30
2.7.14	Circulardichroismus (Kelly <i>et al.</i> , 2005)	30
2.7.15	<i>Pull-down</i> Analyse	31
2.7.15.1	<i>Pull-down</i> Analyse mittels Streptactin-coated magnetic beads	31
2.7.15.2	<i>Pull-down</i> Analyse mittels Protein A coated magnetic beads	31
2.7.16	<i>Bacterial-Two-Hybrid</i> -(BACTH) System	32
2.8	Geräte und Chemikalien	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Herstellung und Reinigung von FocA und dessen Varianten	35
3.2	Bestimmung der Sekundärstruktur der FocA-Varianten	39
3.3	Bestimmung der Quartärstruktur von FocA3, FocA5 und den FocA Varianten	40
3.4	Physiologische Charakterisierung der FocA Varianten	43
3.4.1	<i>In vivo</i> Untersuchungen zur Formiattranslokation im Stamm DH201	43
3.4.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen zur Formiattranslokation im Stamm DH701	46
3.5	Überproduktion der cytosolischen Proteine PflB, PflD, PflF und TdcE	47
3.6	Untersuchungen zu möglichen Interaktionspartnern von FocA	48
3.6.1	FocA abhängige Lokalisation von PflB an der Cytoplasmamembran	48
3.6.2	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Interaktion zwischen FocA und PflB	51
3.6.2.1	<i>Pull-down</i> Assay mit Protein A coated magnetic beads	51
3.6.2.2	<i>Pull-down</i> Assay mit Streptactin coated magnetic beads	52
3.6.2.3	<i>Far Western</i> -Blot Analysen	57
3.6.3	<i>In vivo</i> Untersuchung zur Interaktion zwischen FocA und PflB	62
3.6.3.1	Klonierung in die Plasmide pUT18/pUT18C und pKT25/pKNT25 des BACTH Systems	62
3.6.3.2	Auswertung des BACTH Systems	63

4	Diskussion	65
4.1	Einfluss einzelner Aminosäure-Austausche auf die Stabilität des FocA-Proteins und die Translokation von Formiat über die Membran.....	65
4.2	Die Rolle des N-Terminus in FocA	73
4.3	Interaktion von FocA mit anderen cytosolischen Proteinen	79
4.4	Modell zur Regulation der Formiattranslokation in <i>E. coli</i>	80
5	Zusammenfassung	83
6	Literaturverzeichnis.....	85
7	Anhang	92

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Der Formiat-Stoffwechsel in der anaeroben <i>E. coli</i> Zelle	4
Abb. 2 Änderung eines Säurespektrum im Medium in Abhängigkeit von der optischen Dichte (Suppmann, 1993)	5
Abb. 3 Topologie der transmembranen Segmente des FocA-Monomers aus <i>E. coli</i> nach Suppmann & Sawers, 1994	7
Abb. 4 Kristallstruktur des FocA-Proteins aus <i>E. coli</i> nach Wang <i>et al.</i> (2009)	8
Abb. 5 Kristallstruktur eines PflB-Homodimers (Becker <i>et al.</i> 1999)	9
Abb. 6 Darstellung der Funktionsweise des BACTH Systems	32
Abb. 7 Coomassie gefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel; Analyse der gereinigten FocA-Varianten nach Affinitätschromatografie.	37
Abb. 8 Autoradiogramm nach Western-Blot Analyse eines 12,5%igen SDS Gels nach Reinigung der verschiedenen FocA Varianten;	38
Abb. 9 Fern-UV-CD Spektren der verschiedenen FocA Varianten	39
Abb. 10 BN-Page (5-13,5 %) und Autoradiogramm von FocA5	40
Abb. 11 BN-Page (5-13,5 %) zur Analyse der nativen Struktur verschiedenen FocA-Varianten	41
Abb. 12 Autoradiogramm nach Western-Blot Analyse einer BN-Page (5-13,5 %; w/v) der nativen Form der FocA Varianten	42
Abb. 13 Autoradiogramm der Membranfraktionen (MF) und löslichen Fraktionen (LF) von DH201	44
Abb. 14 Darstellung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität nach anaerober Anzucht des <i>E. coli</i> Stammes DH201;	45
Abb. 15 Darstellung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität nach anaerober Anzucht des <i>E. coli</i> Stammes DH701	46
Abb. 16 Coomassie gefärbtes 10%iges (w/v) SDS-Polyacrylamidgel; Analyse der gereinigten Proteine nach Aufreinigung	48
Abb. 17 Autoradiogramm nach Western-Blot Analyse der Membranfraktion und löslichen Fraktion verschiedener <i>E. coli</i> Stämme;	50
Abb. 18 Autoradiogramm nach Western-Blot Analyse des Protein A pull-downs	51
Abb. 19 Autoradiogramm nach <i>pull-down</i> Analyse mittels Streptactin coated magnetis beads	52
Abb. 20 Autoradiogramm nach <i>pull-down</i> Analyse von FocA5 und FocA3	53
Abb. 21 Autoradiogramm der <i>pull-down</i> Analyse mit verkürztem PflB	54
Abb. 22 Autoradiogramm nach <i>pull-down</i> Analyse mit TdcE	55
Abb. 23 Autoradiogramm der <i>pull-down</i> Analyse in Gegenwart von DDM	56
Abb. 24 Autoradiogramm nach <i>pull-down</i> Analyse mit PflD _{His} und PflF _{His}	57
Abb. 25 Autoradiogramm nach <i>Far Western</i> -Blot Analyse einer 5-13,5%igen (w/v) BN-Page	58
Abb. 26 Autoradiogramm nach <i>Far Western</i> -Blot Analyse mit PflB _{His}	59
Abb. 27 Autoradiogramm nach <i>Far Western</i> -Blot Analyse mit PflF _{His}	60
Abb. 28 Autoradiogramm einer <i>Far Western</i> -Blot Analyse mit PflD _{His} und HypF _{His}	61
Abb. 29 Darstellung der verschiedenen Konstrukte von <i>pflB</i> für das BACTH System	62
Abb. 30 β -Galaktosidase Aktivitäten des Bacterial Two Hybrid Systems	63
Abb. 31 Postulierter Mechanismus der Formiattranslokation in <i>V. cholerae</i> nach Waight <i>et al.</i> , 2010	66
Abb. 32 Darstellung der Engstellen im selektiven Filter des FocA-Proteins aus <i>E. coli</i> (Wang <i>et al.</i> 2009)	67
Abb. 33 Darstellung der Lokalisation von D190 und K191 im FocA Protein	69
Abb. 34 Zusammenfassende Darstellung des Einflusses einzelner AS auf die Formiattranslokation	70
Abb. 35 Darstellung der verschiedenen Formen von FocA aus <i>S. typhimurium</i> (nach Lü <i>et al.</i> 2011)	73
Abb. 36 Schematische Darstellung der Interaktion von FocA und PflB, sowie der Regulation durch PflB	81
Abb. 37 Alignment der AS Sequenzen verschiedener FocA Proteine aus unterschiedlichen Organismen mit FocA aus <i>E. coli</i>	95
Abb. 38 Alignment verschiedener Mitglieder der FNT-Familie	96
Abb. 39 Alignment verschiedener Vertreter der GRE-Familie aus <i>E. coli</i>	98

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Deletion
λ	Lambda
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent
AHT	Anhydrotetracyclin
AK	Antikörper
Amp ^R	Ampicillin Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserum-Albumin)
c	Konzentration
Cm ^R	Chloramphenicol Resistenz
d	Durchmesser
DDM	n-Dodecylmaltosid
dest	destilliert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Detektionsverfahren für Western-Blots (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-carbonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
Kan ^R	Kanamycin Resistenz
kDa	Kilo Dalton
LB	lysogenes Medium
LF	lösliche Fraktion
M	Molar
MF	Membranfraktion
Mw	<i>molecular weight</i> , Molekularmasse
μF	Mikrofarad
min	Minute
N-Terminus	Amino-Terminus
Ω - Schleife	Omega-Schleife
OD	optische Dichte
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewicht pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen

Tabelle 1 Aminosäuren und deren Abkürzungen

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
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

1 Einleitung

Seit mehr als 100 Jahren wird das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* in Forschungslaboratorien als einer der wichtigsten Modell-Organismen verwendet. Auf den ersten Blick erscheint dies verwunderlich, da *E. coli* nicht genutzt werden kann um einige der faszinierendsten Prozesse in der Zell-Biologie zu untersuchen. *E. coli* ist nicht in der Lage sich zu differenzieren (wie z. B. *Caulobacter*), zu sporulieren (wie z. B. *Bacillus*), Stickstoff zu fixieren (wie z. B. *Klebsiella*) oder unter sehr extremen Umweltbedingungen zu leben (wie z.B. *Thermus*). Dennoch gibt es Gründe, warum *E. coli* als Modell-Organismus gewählt wurde und auch heute noch verwendet wird. Die Tatsache, dass es genetisch zugänglich, nicht stark infektiös und leicht zu kultivieren ist, führt dazu, dass es noch heute in vielen Laboren verwendet wird. Seine geringe Verdopplungszeit ist ebenfalls von Vorteil. Heutzutage wird *E. coli* oftmals als Modell-Organismus gewählt, da es der von allen Lebewesen am meisten erforschte Bakterium ist. Trotz unseres verhältnismäßig breiten Wissen sind viele Mechanismen, Regulationsprozesse und Prozesse des Metabolismus bei *E. coli* noch weitestgehend unbekannt.

E. coli gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und wird der Gruppe der gamma-Proteobakterien zugeordnet. Es besitzt im Hinblick auf den Energiemetabolismus eine Vielfalt an bioenergetischen Strategien. Trotz dieser Vielfalt verstoffwechselt *E. coli* bevorzugt Kohlenhydrate, wie Glukose, welche es über das Phosphotransferase-System aufnimmt (Kotrba *et al.*, 2001). *E. coli* ist auch in der Lage unter anaeroben Bedingungen zu wachsen. Dabei nutzt es alternative terminale Elektronenakzeptoren, wie Nitrat, Nitrit, Fumarat, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) (Haddock & Jones, 1977; Strøm *et al.*, 1979; van der Plas *et al.*, 1983). Sowohl unter aeroben, als auch anaeroben Bedingungen nutzt *E. coli* den Weg der Glykolyse zur Verstoffwechselung von Glukose. Das hierbei entstandene Pyruvat kann durch die Pyruvat-Dehydrogenase oder die Pyruvat-Formiat-Lyase zu Acetyl-CoA verstoffwechselt werden. Der Citrat-Zyklus ist unter anaeroben Bedingungen weitgehend reprimiert. Entstandene Reduktionsäquivalente können zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über die Membran genutzt werden und anschließend wird die Energie in Form von ATP konserviert. In Abwesenheit von externen Elektronenakzeptoren stellt *E. coli* seinen Stoffwechsel auf die gemischte Säuregärung um. Dabei wird unter anderem das gebildete Pyruvat zu Formiat und Acetyl-CoA nicht oxidativ gespalten (Knappe & Sawers, 1990), wobei die Energiekonservierung über Substratkettenphosphorylierung erfolgt. Um den Redoxausgleich zu sichern, wird das produzierte Acetyl-CoA durch die

Alkoholdehydrogenase zu Ethanol reduziert und somit kann NAD^+ regeneriert werden. Zur Konservierung von Energie in Form von ATP kann Acetyl-CoA auch zu Acetat verstoffwechselt werden (Wanner & Wilmes-Riesenberg, 1992).

Formiat ist ein Schlüsselsubstrat und regulatorisches Molekül in der anaeroben Fermentation. Mit einem Redoxpotential von -420 mV kann es unter anaeroben Bedingungen in *E. coli* und anderen Bakterien als Elektronendonator für die Reduktion von Nitrat oder Nitrit bzw. Fumarat genutzt werden (Macy *et al.*, 1976; Wimpenny & Cole, 1967). Da größere Mengen von Formiat zur Ansäuerung des Cytoplasmas führen und somit toxisch für die Zelle sein können (Russell, 1992), gibt es in *E. coli* mehrere Mechanismen um intrazellulär entstandenes oder extrazellulär aufgenommenes Formiat zu beseitigen. Die Formiatdehydrogenasen (Fdh) sind in der Lage Formiat zu Kohlenstoffdioxid zu oxidieren. In *E. coli* gibt es drei verschiedene Fdh's, bei denen es sich immer um selenocysteininhaltige Molybdo-Enzyme handelt (Sawers, 2005). Die FdhF ist ein cytoplasmatisch lokalisiertes Protein, welches gemeinsam mit der Hydrogenase 3 den Formiat-Hydrogen-Lyase (FHL) Komplex bildet und in der Lage ist unter strikt anaeroben Bedingungen Formiat zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff zu spalten. Die Fdh-H wird durch das *fdhF*-Gen codiert, dessen Expression durch den Regulator FhIA nur in Anwesenheit von Formiat induziert wird (Rossmann *et al.*, 1991; Sawers, 2005). Zudem hat *E. coli* 2 weitere membrangebundene Fdh's (Fdh-O und Fdh-N) deren aktives Zentrum im Periplasma lokalisiert ist (Berg *et al.*, 1991; Sawers, 1994). Die Fdh-O wird unter aeroben und anaeroben Bedingungen synthetisiert, während die Fdh-N nur unter anaeroben Bedingungen und in Anwesenheit von Nitrat synthetisiert wird (Enoch & Lester, 1975). Daher kann Fdh-N die Formiat-Oxidation mit der Nitrat-Reduktion koppeln (Sawers *et al.*, 1991; Sawers, 2005). Der Formiat-Stoffwechsel von *E. coli* ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

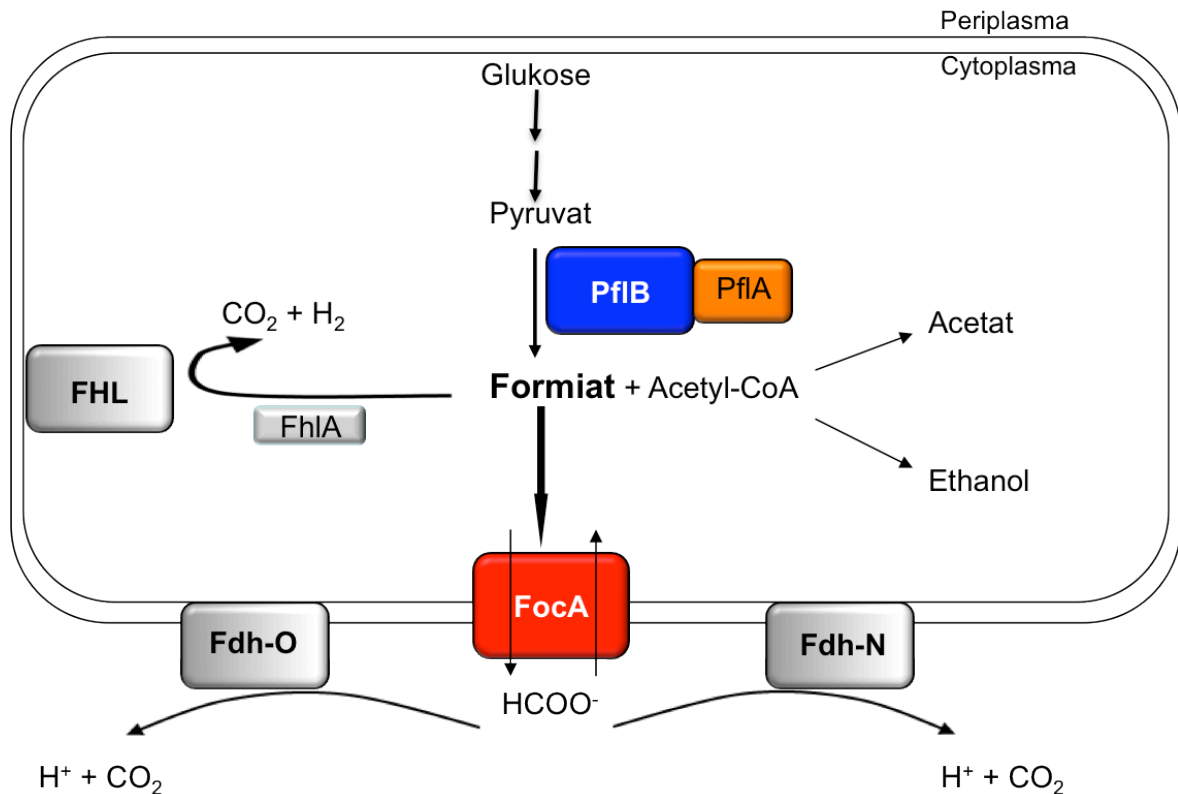


Abb. 1 Der Formiat-Stoffwechsel in der anaeroben *E. coli* Zelle

PflB, Pyruvat-Formiat-Lyase; PflA, Pyruvat-Formiat-Lyase-Aktivase; FHL, Formiat-Hydrogen-Lyase; FhlA, Formiat-Hydrogen-Lyase Transkriptionsregulator; Fdh-O, Formiatdehydrogenase O; Fdh-N, Formiatdehydrogenase N; FocA, *formate channel A*.

Da Formiat im Cytoplasma entsteht, muss es die Membran zunächst passieren um anschließend im Periplasma zur Energiekonservierung in CO₂, Protonen und Elektronen umgesetzt zu werden. Mit einem pK_a-Wert von 3,75 liegt unter physiologischen Bedingungen nur ein sehr kleiner Teil von Formiat in der undissoziierten Form vor. Nur in dieser Form ist Formiat in der Lage die Membran mittels Diffusion zu passieren. Bernhard Suppmann (Doktorarbeit, 1993) nahm ein Säurespektrum im Medium auf und konnte zeigen, dass Formiat zunächst in das Medium abgegeben wird und in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase wieder aufgenommen wird (Abb. 2). Pyruvat verbleibt in der Zelle und Acetat wird lediglich exportiert.

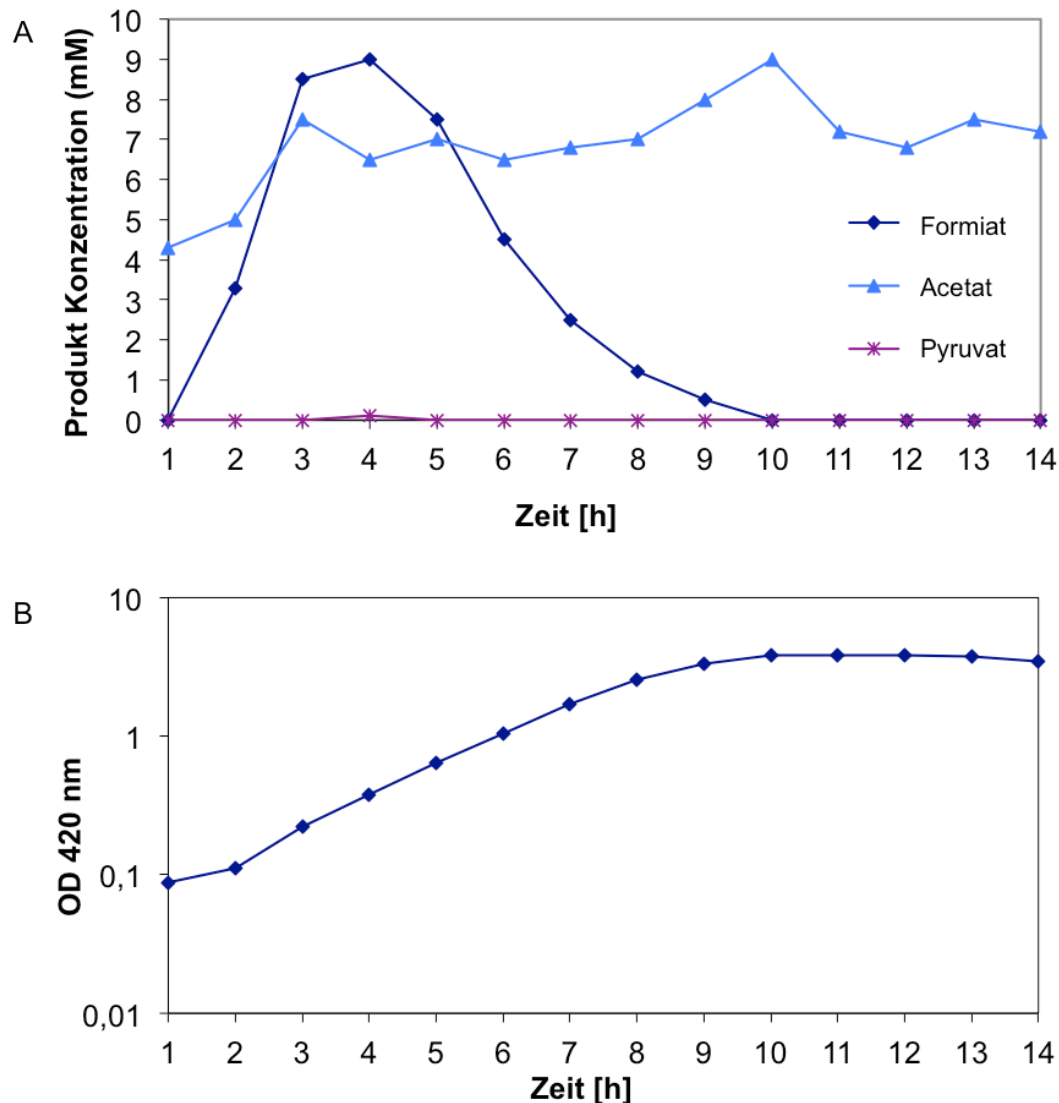


Abb. 2 Änderung eines Säurespektrum im Medium in Abhängigkeit von der optischen Dichte (Suppmann, 1993)

A: Säurespektrum im Medium einer anaerob wachsenden *E. coli*-Kultur über einen Zeitraum von 14 h.

B: Wachstumskurve einer anaerob wachsenden *E. coli*-Kultur

Da Diffusion zum größten Teil ausgeschlossen werden konnte, muss in *E. coli* ein Translokationssystem für Formiat existieren. Mit dieser Frage beschäftigten sich bereits 1994 schon Suppmann & Sawers. Ihnen gelang es durch *knock-out* Mutanten ein Gen zu identifizieren, dessen Genprodukt wahrscheinlich einen Formiat-Transporter darstellt. Dieses Gen wurde als *focA* (*formate channel A*) bezeichnet und liegt zusammen mit dem Gen *pflB*, welches für die Pyruvat-Formiat-Lyase codiert, in einem Operon (Sawers & Böck, 1989; Sawers, 2006; Suppmann & Sawers, 1994). Unter anaeroben Bedingungen wird die Expression des *focA-pflB* Operons durch die Transkriptionsfaktoren ArcA und FNR reguliert (Drapal & Sawers, 1995; Sawers & Suppmann, 1992; Sawers, 2006). Dabei wird die Transkription an verschiedenen Promotoren reguliert, wobei der Promotor 6a

schwach konstitutiv exprimiert wird (Sawers, 2006). Stromabwärts des *pfIB*-Gens liegt das Gen *pfIA*, welches für die Aktivase der Pyruvat-Formiat-Lyase codiert (Rödel *et al.*, 1988; Sawers & Böck, 1989). Durch einen starken Terminator hinter dem *pfIB*-Gen wird eine Cotranskription mit *focA-pfIB* verhindert (Sauter & Sawers, 1990).

Untersuchungen über den Einfluss der *focA*-Deletion auf die Formiattranslokation zeigten, dass der Stamm ohne FocA eine um 50 % reduzierte Menge an Formiat exportiert und anschließend reimportiert (Suppmann & Sawers, 1994). Diese Ergebnisse zeigten, dass neben FocA noch ein weiteres Translokationssystem für Formiat existieren muss. Erste Analysen zu einem potentiellen Translokator wurden von L. Beyer (Diplomarbeit, 2009) angefertigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es mindestens 2 weitere Translokatoren geben muss, wobei einer von beiden cAMP-abhängig ist.

Das FocA-Protein wird aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeiten zum Nitrit-Transporter NirC aus *E. coli* (Peakman *et al.*, 1990) und FdhC aus *Methanobacterium formicium* (White & Ferry, 1992) in die Familie der Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) eingeordnet (*Transport Classification Database*; Klasse 2.A.44; (Saier *et al.*, 1999)). Kürzlich wurde ein weiteres Mitglied dieser Familie charakterisiert, welches eine eigene Gruppe bildet: das HSC-Protein aus *C. difficile*. Dieses Membranprotein ist in der Lage Hydrosulfid, sowie Nitrat und Formiat zu translozieren (Czyzewski & Wang, 2012). Alle Mitglieder der FNT-Familie sind integrale Membranproteine und zeichnen sich durch eine Länge von 256-285 Aminosäuren (AS), sowie 6 - 8 transmembrane Helices aus. Für das FocA-Protein aus *E. coli* wurden 6 transmembrane Helices, eine Gesamtlänge von 285 AS und eine berechnete Molekularmasse von 30,5 kDa postuliert (Suppmann & Sawers, 1994). Eine theoretische Topologie von FocA ist in Abb. 3 dargestellt.

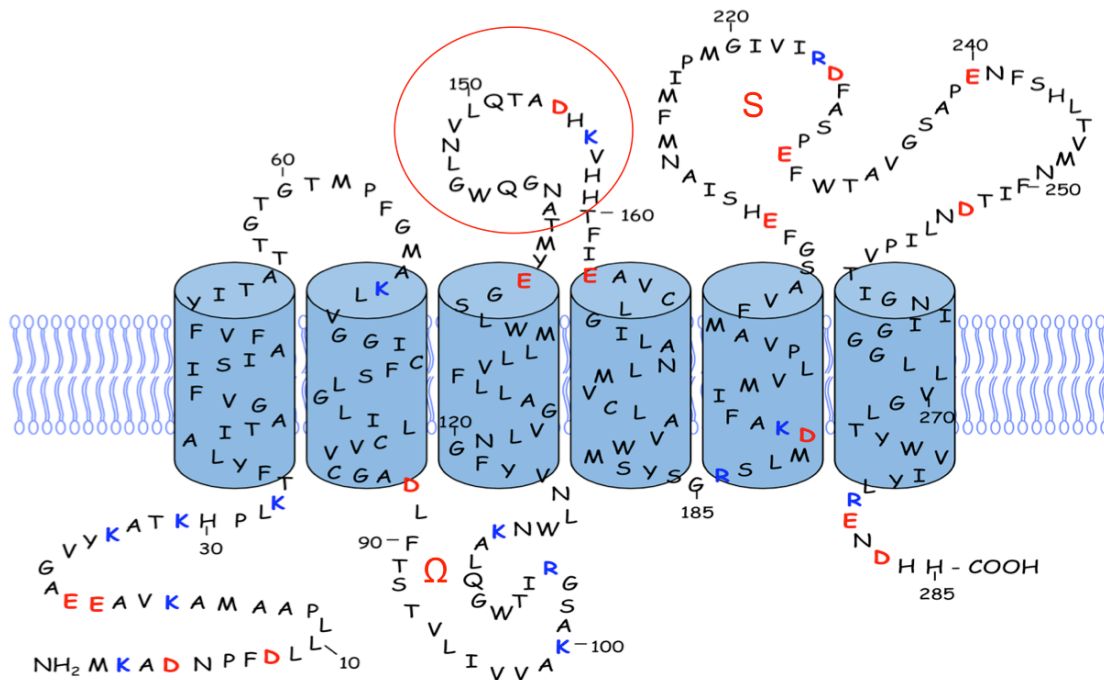


Abb. 3 Topologie der transmembranen Segmente des FocA-Monomers aus *E. coli* nach Suppmann & Sawers, 1994

Ω: entspricht der Ω-Schleife; S entspricht der S-Schleife; blau: basische AS; rot: saure AS; in rot eingrahmt sind Bereiche, welche durch den Antikörper 8075 erkannt werden

Wie in Abb. 3 zu sehen ist, sind sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert. Zusätzlich ist im Cytoplasma eine Schleifen-Struktur zu erkennen, welche als Ω-Schleife bezeichnet wird. Eine weitere Schleifen-Struktur befindet sich im Periplasma und wird als S-Schleife bezeichnet.

In SDS-Page-Analysen konnte gezeigt werden, dass das hydrophobe Membranprotein FocA bei einer Größe von ca. 23 kDa migriert und somit ein abweichendes Laufverhalten zur berechneten Molekularmasse von 30,5 kDa zeigt (Falke *et al.*, 2010; Suppmann & Sawers, 1994). Mittels ersten Sekundärstruktur-Analysen konnte FocA als ein Protein mit überwiegend α -helikalem Charakter identifiziert werden. Durch *Blue-Native-Page* Analysen konnte erstmals die native Struktur von FocA aus *E. coli* näher charakterisiert werden. Es zeigte sich, dass FocA wahrscheinlich als Pentamer in der Membran vorliegt (Falke *et al.*, 2010).

Im Jahr 2009 gelang es der ersten Forscher-Gruppe das FocA-Protein aus *E. coli* zu kristallisieren (Wang *et al.*, 2009). Anhand der Struktur konnte gezeigt werden, dass es sich bei FocA um ein Homopentamer handelt in dem jedes Monomer für sich eine Pore bildet und das Pentamer ebenfalls zusätzlich eine zentrale Pore aufweist. Sechs asymmetrisch angeordnete α -Helices durchspannen die Membran, wobei es sich bei zwei von ihnen um unterbrochene Helices handelt (Helix 2 und 5). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu dem Aquaglyceroporin GlpF wurde postuliert, dass es sich bei FocA

wahrscheinlich eher um einen Kanal handelt als um einen Transporter. Die Kristallstruktur des FocA-Proteins ist in Abb. 4 dargestellt.

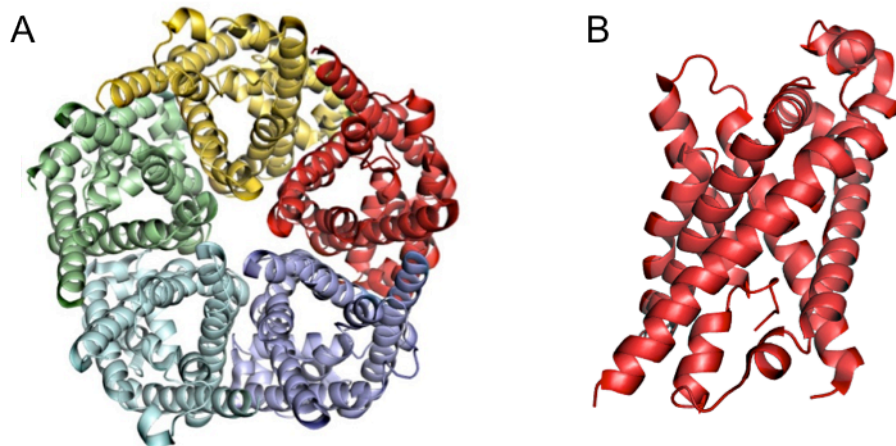


Abb. 4 Kristallstruktur des FocA-Proteins aus *E. coli* nach Wang *et al.* (2009); PDB 3KCV; 2,25 Å

A: Pentamer des FocA-Proteins aus periplasmatischer Sicht

B: Monomer des FocA-Proteins aus der Membranansicht

Das FocA-Pentamer weist eine Höhe von 55 Å sowie einen Durchmesser von 80 Å auf. In der Struktur konnte gezeigt werden, dass die zentrale Pore die Form eines „Weinglases“ besitzt, wobei es einen hydrophoben Hauptkörper gibt, einen Stiel und einen positiv geladenen Boden. An der engsten Stelle hat das „Weinglas“ einen Durchmesser von 4,5 Å. In dieser Veröffentlichung wird allerdings nicht davon ausgegangen, dass Formiat durch die zentrale Pore transloziert wird, da gezeigt werden konnte, dass diese in den Kristallen mit Detergenzmolekülen gefüllt war. Dies lässt darauf schließen, dass die zentrale Pore in der Cytoplasmamembran wahrscheinlich mit Lipidmolekülen gefüllt ist (Wang *et al.*, 2009). Kurze Zeit später wurde die Struktur von FocA aus *Vibrio cholerae* aufgeklärt (Waight *et al.*, 2010). Auch diese Gruppe postulierte, dass die monomere Pore von FocA für die Translokation von Formiat wichtig ist. Zudem wurde eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen den AS Histidin 208 und Threonin 90 identifiziert, welche eine Engstelle in der monomeren Pore bildet. Es konnte gezeigt werden, dass Formiatmoleküle im selektiven Filter die Position von Threonin 90 einnehmen können und somit den Kanal öffnen. Eine Struktur des FocA-Proteins aus *Salmonella typhimurium* konnte 2011 von Lü *et al.* analysiert werden. Im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Strukturen wurde die Kristallisation bei einem pH Wert von 4,0 durchgeführt und somit ein pH-abhängiger Sensierungsmechanismus vorgeschlagen. Die Strukturen aller Gruppen unterschieden sich nur minimal. Der einzige wesentliche Unterschied war, dass Lü *et al.* (2011) als einzige in der Lage waren einen Teil des N-Terminus zu kristallisieren. Dies lässt schlussfolgern, dass der N-Terminus von FocA wahrscheinlich sehr flexibel ist und somit an der Entscheidung, ob Formiat importiert oder exportiert wird, beteiligt sein könnte. Jedoch waren die postulierten Translokationsmechanismen bei allen Gruppen

unterschiedlich. Die Beteiligung verschiedener AS an der Translokation wurde vorgeschlagen, jedoch bisher nur *in-vitro* gezeigt.

Obwohl drei Kristallstrukturen veröffentlicht und erste Mechanismen der Translokation postuliert wurden, ist bis heute unklar, wie der Export und Import von Formiat über FocA reguliert wird. Eine Möglichkeit stellt die pH-abhängige Änderung der Konformation von FocA dar, wie sie schon von Lü *et al.* (2011) beobachtet werden konnte. Eine weitere Möglichkeit wäre die Regulation über einen Interaktionspartner. Protein-Protein Interaktionen sind in fast allen zellulären Prozessen involviert und regulieren eine Vielzahl von Stoffwechselwegen (Gascoigne & Zal, 2004; Pawson & Nash, 2000; Warren, 2002). Aufgrund der Tatsache, dass das Gen, welches für FocA codiert mit dem Gen *pfIB* in einem Operon liegt und die Transkription beider Gene koordiniert reguliert wird, wurde vermutet, dass FocA mit PflB interagieren könnte. Es konnte schon für den Ammoniumtransporter AmtB in *E. coli* gezeigt werden, dass dieser Transporter durch ein cytosolisches Protein (GlnK) reguliert wird, dessen Gen in einem Operon mit *amtB* lokalisiert ist (Coutts *et al.*, 2002). Zudem ist PflB das Enzym, welches die größte Menge an Formiat in *E. coli* produziert. PflB hat eine berechnete Molekularmasse von 85 kDa und liegt im Cytoplasma als 170 kDa Homodimer vor (Becker & Kabsch, 2002; Becker *et al.*, 1999). Die Kristallstruktur eines PflB – Homodimers ist in Abb. 5 gezeigt.

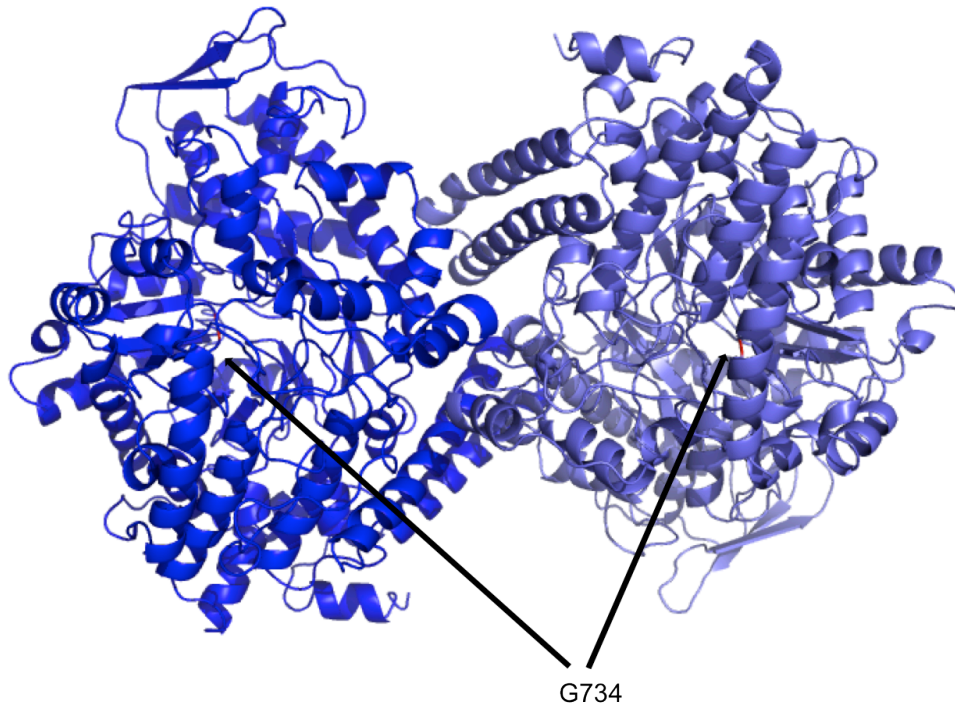


Abb. 5 Kristallstruktur eines PflB-Homodimers (Becker *et al.* 1999)

Angefärbt sind beide Monomere, Glycin an Position 734 mit Pfeil gekennzeichnet; PDB: 1MZO; Auflösung 2,70 Å

PflB wird der Klasse der Glycyl-Radikal-Enzyme zugeordnet, da es in der Lage ist die radikal-abhängige Spaltung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A und Formiat zu

katalysieren (Knappe & Sawers, 1990). Damit nimmt es eine zentrale Rolle im Gärungsstoffwechsel von *E. coli* ein. PflB wird sowohl unter anaeroben, als auch aeroben Bedingungen synthetisiert, wobei die gebildete Menge in aerob gewachsenen Zellen deutlich geringer ist (Sawers & Watson, 1998). Bevor PflB in der Lage ist Pyruvat nicht-oxidativ zu spalten, muss es durch eine 28 kDa große Aktivase (PflA) aktiviert werden. Dieses Enzym trägt ein 4Fe-4S-Cluster und katalysiert unter der Beteiligung von S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Cosubstrat und reduziertem Flavodoxin eine Radikal-Bildung am Glycin 734 des PflB-Proteins (Wagner *et al.*, 1992). Das Glycylradikal ist durch Elektronentransfer in der Lage, ein Thiyl-Radikal am Cys 418/419 zu bilden, was die homolytische Spaltung von Pyruvat vermittelt, welches am Cys 419 kovalent gebunden ist (Parast *et al.*, 1995). Durch den Kontakt mit Sauerstoff am Gly 734 zerfällt das Protein in ein 82 kDa und ein 3 kDa Fragment (Wagner *et al.*, 1992). Diese Spaltung ist irreversibel und findet wahrscheinlich nur nach Zellaufschluss statt. Es wurde früher postuliert, dass das multienzymatische AdhE-Protein in der Lage ist die aktive Form des PflB wieder in die inaktive Form zu überführen (Kessler *et al.*, 1992). Diese Vermutung gilt heute als umstritten (Nnyepi *et al.*, 2007). Entscheidend für die Aktivierung (anaerobe Bedingungen) bzw. Inaktivierung (aerobe Bedingungen) von PflB ist der NAD/NADH-Status der Zelle (Kessler *et al.*, 1992).

Neben PflB ist ein weiteres Glycyl-Radikal-Protein in der Lage die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A und Formiat zu katalysieren: TdcE. TdcE ist eine 2-Ketobutyrat-Formiat-Lyase mit einer 78%igen Identität und 91%igen Ähnlichkeit zu PflB (Hesslinger *et al.*, 1998). TdcE wird codiert vom gleichnamigen Gen, welches im multicistronischen *tdcABCDEFG*-Operon lokalisiert ist (Goss *et al.*, 1988; Hesslinger *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass TdcE in der Abwesenheit von PflB dessen Funktion im Formiatstoffwechsel übernehmen kann (Sawers *et al.*, 1998). Eine Interaktion von TdcE und FocA konnte erstmals von D. Falke (Diplomarbeit, 2010) gezeigt werden.

Aus dem ersten Teil der Einleitung ergab sich das erste Ziel dieser Arbeit: Mittels gezielter Mutagenese sollten AS identifiziert und charakterisiert werden, die an der Translokation von Formiat über die Cytoplasmamembran beteiligt sind.

Die Charakterisierung einer möglichen Interaktion von PflB bzw. TdcE mit FocA sollte das zweite Ziel dieser Arbeit sein. Somit sollte mit dieser Arbeit der Mechanismus der Formiat-Translokation sowie eine mögliche Regulation näher charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme sind in Tabelle 2, verwendete Vektoren, sowie hergestellte Plasmide in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 2 Verwendete *E. coli* Stämme

<i>Escherichia coli</i> Stamm	Genotyp bzw. Phänotyp	Referenz
MC4100	F- <i>araD</i> 139 Δ (<i>argF-lac</i>) U 169 <i>ptsF25 deoC1 relA1 flbB530</i> <i>rpsL</i> 150 λ -	Casadaban & Cohen, 1979
XL1-Blue	<i>hsdR17 endA1 supE44, thi-1,</i> <i>recA1, gyrA96, relA1, lac</i> [F ⁺ <i>proAB, lacI</i> ^f Z Δ M15, Tn10]	Stratagene, Amsterdam, NL
BL21 (DE3)	F- <i>ompT lon hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm+ Tet^r gal</i> λ (DE3) <i>endA</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
DHM1	<i>cya-854 recA1 gyrA96</i> (Nal) <i>thi1 hsdR17 spoT1 rfbD1</i> <i>glnV44</i> (AS)	Stratagene, Amsterdam, NL
RM201	MC4100 Δ <i>focA</i> Δ <i>pflB</i> , Cm ^R	Sawers & Böck, 1988
DH201	RM201 λ (<i>fdhF::lacZ</i>) Cm ^R Kan ^R	Beyer, 2009
REK701	MC4100 (<i>focA</i> ⁻)	Suppmann & Sawers, 1994
DH701	REK701 λ (<i>fdhF::lacZ</i>) Kan ^R	Beyer, 2009
234M1	MC4100 Δ <i>pflA</i> Cm ^R	G. Sawers
REK702	MC4100, in <i>focA</i> Mutation des translationellen Start-Codons GTG zu ATG	Suppmann & Sawers, 1994
RM223	MC4100 Δ <i>pflB</i> , Δ <i>pflA</i> , Δ <i>tdcE</i>	Hesslinger <i>et al.</i> , 1998

Tabelle 3 Verwendete Plasmide

Plasmid	Vektor	Genotyp	Referenz, Quelle
pASK-IBA3	pASK-IBA3	Expressionsvektor, fl-IG, <i>bla</i> , <i>ori</i> , <i>tlpp</i> , <i>tet</i> - Repressor, <i>tetA</i> -Promotor/Operator, <i>Strep</i> -tag II C-terminal	IBA Biotagnologies, Göttingen
pASK-IBA5	pASK-IBA5	Expressionsvektor, fl-IG, <i>bla</i> , <i>ori</i> , <i>tlpp</i> , <i>tet</i> - Repressor, <i>tetA</i> -Promotor/Operator, <i>Strep</i> -tag II N-terminal	IBA Biotagnologies, Göttingen
pASK-IBA3focA	pASK-IBA3	<i>focA</i> in pASK-IBA3	Falke, 2010
pASK-IBA5focA	pASK-IBA5	<i>focA</i> in pASK-IBA5	Falke, 2010
p29	pACYC184	<i>focA-pflB-pflA</i> in pACYC184	Christiansen und Pederson (1981)
p29/1	pACYC184	<i>pflB-pflA</i> in pACYC184	G. Sawers
pKT25	pSU40	Plasmid, welches T25 Fragment von <i>CyaA</i> codiert	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pKNT25	pSU40	Plasmid, welches T25 Fragment von <i>CyaA</i> codiert	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUT18	pUC19	Plasmid, welches T18 Fragment von <i>CyaA</i> codiert	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUT18C	pUC19	Plasmid, welches T18 Fragment von <i>CyaA</i> codiert	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pKT25focA	pKT25	<i>focA</i> in pKT25	diese Arbeit
pKNT25focA	pKNT25	<i>focA</i> in pKNT25	diese Arbeit
pUT18CpflB	pUT18C	<i>pflB</i> in pUT18C	diese Arbeit
pUT18CpflB (1-424)	pUT18C	<i>pflB</i> (AS 0-424) in pUT18C	diese Arbeit
pUT18pflB (414-603)	pUT18	<i>pflB</i> (AS 414-603) in pUT18	diese Arbeit
pUT18CpflB (603-752)	pUT18C	<i>pflB</i> (AS 603-752) in pUT18C	diese Arbeit
FocA5 (K26A)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (C74S)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (L79A)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (C82S)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (K156E)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (V175A)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (C176S)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (W180F)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (D190A)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (D190K)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (K191A)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (F202A)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (E208A)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (H209Y)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (N213D)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (N113S/ F207A)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
FocA5 (H209Y/T91A)	pASK-IBA5	Mutation im <i>focA</i> Gen	diese Arbeit
PflB (JW0886)	pCA24N	<i>pflB</i> in pCA24N mit N-terminalen His tag	ASKA Library, Japan
PflD (JW3923)	pCA24N	<i>pflD</i> in pCA24N mit N-terminalen His tag	ASKA Library, Japan
PflF (JW0807)	pCA24N	<i>pflF</i> in pCA24N mit N-terminalen His tag	ASKA Library, Japan

2.2 Nährmedien und Zusätze

2.2.1 LB-Medium

Die Anzucht der *E. coli* Stämme erfolgte im Vollmedium *lysogeny broth* (Sambrook *et al.*, 1989).

Zusammensetzung:

Pepton aus Casein (w/v)	1 %
NaCl (w/v)	1 %
Hefeextrakt (w/v)	0,5 %

Zur Herstellung von LB-Agar erfolgte die Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar-Agar zum LB-Medium.

2.2.2 TB-Medium

Zur Aufreinigung rekombinanter Proteine erfolgte die Kultivierung der entsprechenden Expressionsstämme im *terrific broth* (TB)-Medium.

Zusammensetzung:

Pepton aus Casein (w/v)	1,2 %
Hefeextrakt (w/v)	2,4 %
98 % Glycerin (w/v)	0,4 %

Die Zusätze, die nach dem Autoklavieren hinzugegeben wurden, sind der Tab. 4 zu entnehmen. Die Zusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt ebenfalls 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Medienzusätze für TB-Medium

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Aspartat	20 % (w/v) in H ₂ O _{dest.} steril filtriert	0,375 % (v/v)
Kaliumphosphatpuffer pH 7,0	1 M in H ₂ O _{dest.}	100 mM
Glukose	20 % (w/v) in H ₂ O _{dest.}	0,8 % (v/v)
MgSO ₄	1 M in H ₂ O _{dest.}	2 mM
Anhydrotetracyclin (AHT) (steril filtriert)	2 mg/ml in DMF	0,2 µg/ml

2.2.3 TGYEP-Medium

Für die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität in rekombinanten *E. coli*-Stämmen wurden diese in TYEP (Trypton-Glukose-Phosphat)-Medium mit 0,4 % (w/v) Glukose in der Hauptkultur angereichert. Nach Zusatz dieser Kohlenstoffquelle wurde das Medium fortan als TGYEP-Medium bezeichnet.

Zusammensetzung:

Pepton aus Casein (w/v)	1,0 %
Hefeextrakt (w/v)	0,5 %

Dem Medium wurde nach dem Autoklavieren, neben 0,4 % (w/v) Glukose, 100 mM Kaliumphosphatpuffer zugesetzt. Die Anzucht erfolgte sowohl ohne als auch mit Zugabe von 20 mM Natriumformiat. Natriumformiat wurde als 5 M Stammlösung steril filtriert und dem abgekühlten Medium nach dem Autoklavieren zugesetzt.

2.2.4 Antibiotika

Den verwendeten Medien wurden die in Tab. 5 aufgelisteten Antibiotika je nach Stamm zugesetzt. Alle Antibiotika wurden vor der Nutzung steril filtriert.

Tabelle 5 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	125 µg/ml
Chloramphenicol	50 mg/ml in Ethanol	12,5 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	50 µg/ml

2.3 Zellanzucht

Die Zellanzucht erfolgte in allen Fällen durch Beimpfen des Flüssigmediums mit Einzelkolonien eines 13-Strich Verdünnungsausstriches von einer bei 4 °C gelagerten Nähragarplatte. Für eine Vereinzlung wurden die in Tabelle 2.1 aufgelisteten Organismen aus einer Glycerinkultur mit Hilfe einer ausgeglühten Impföse auf die Nähragarplatten ausgestrichen und für 12 h bei 37 °C kultiviert.

2.3.1 Analyse des Bakterienwachstums

Das Wachstum der Bakterien konnte photometrisch am Photometer Spekol 1200 (Carl Zeiss Technologie, Jena) durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) dokumentiert werden. Als Leerwert wurde das entsprechende unbeimpfte

Medium mitgeführt. Die anaerobe Anzucht in Hungate-Röhrchen ermöglichte die direkte Bestimmung der optischen Dichte im Röhrchen ohne vorherige Probenentnahme. Bei allen anderen Anzuchten wurde die Messung in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Volumen von 1 ml durchgeführt. Die Septen der Serumflaschen wurden vor Probenentnahme mit Ethanol abgeflammt. Durch sterile Einmalspritzen wurde 1 ml Probe zur Messung entnommen.

2.3.2 Aerobe Anzucht

Die aerobe Anzucht der Expressionsstämme erfolgte in Schikanekolben, die das 5-fache des Anzuchtvolumen fassen, was für eine optimale Sauerstoffversorgung sorgte. Dem Medium wurde vor der Beimpfung das entsprechende Antibiotikum zugesetzt und die Kultur anschließend bei 37 °C auf einem Rundschüttler bei 100 upm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C, 2990 g für 25 min.

Die Anzucht von Bakterienkulturen zur späteren Plasmidpräparation, Vorkulturen und Anfertigung von Glycerinkulturen wurde unter aeroben Bedingungen in Kulturröhrchen, welche mit Kapsenbergkappen verschlossen wurden, durchgeführt. Dafür wurden die Zellen bei 37 °C und 200 upm auf einem Rundschüttler für ca. 12 h inkubiert. Für die Zellernte erfolgte die Zentrifugation der Kulturen für 10 min bei 2990 g.

2.3.3 Semianaerobe Anzucht

In diesem Abschnitt wird beschrieben wie die semianaerobe Anzucht von *E. coli* durchgeführt wurde. Es erfolgte keine Begasung des Mediums oder der Gefäße. Zur Gewinnung der einzelnen Zellfraktionen wurden die in 2.1 aufgelisteten Stämme in Serumflaschen mit einem Fassungsvermögen von 500 ml in Flüssigkulturen kultiviert. Um ein anaerobes Milieu zu schaffen, wurden die Serumflaschen mit 570 ml Medium bis zum Septumverschluss befüllt. Die Hauptkultur wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,08-0,1 mit einer Übernachtskultur beimpft. Nach Zugabe von 0,4 % (w/v) Glukose und den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen wurden die Kulturen stehend bei 37 °C bis zur Zellernte kultiviert.

Zum Nachweis der β -Galactosidase-Aktivität wurden die rekombinanten *E. coli* Stämme in TGYEP-Medium in Hungate-Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 15 ml kultiviert. Den jeweiligen Stämmen wurden entsprechende Mengen (0-50 mM) an Formiat zugegeben. Der schnelle Verbrauch des restlichen Sauerstoffs im Medium während des Wachstums wurde durch Befüllung der Röhrchen mit 14 ml TGYEP-Medium gewährleistet. Danach erfolgte die Anzucht nicht schüttelnd bei 37 °C.

2.3.4 Zellernte

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C und 2990 g (Sorvall RC6 Plus (F10S-6x500y), Thermo Fisher Scientific, USA) für 30 min. Anschließend wurde das erhaltene Zellpellet in 1/100 Kulturvolumen 100 mM Tris/HCl pH 7,4 gewaschen und erneut zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Zellpellet bei – 20 °C gelagert.

2.3.5 Stammhaltung

Die *E. coli* Stämme wurden auf LB-Agar Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen, bei 37 °C ca. 12 h inkubiert und bis zu vier Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Rekombinante Stämme wurden als Glycerinkulturen gelagert. Hierzu wurden die Kulturen im LB-Medium angezogen, anschließend mit Glycerin (Endkonzentration 10 % (w/v)) versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.3.6 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (Griffith & Wolf, 2002)

Für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden die Zellen in TGYEP-Medium bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,8 angezogen. Für jede Messung wurden je 3 Kulturen angezogen und diese jeweils 3-fach gemessen. Eine 100 μ l Kultur wurde in 1 Well einer 96 er Mikrotiterplatte pipettiert, mit 20 μ l Aufschlusspuffer (9 ml Puffer Z (60 mM NaH₂PO₄; 40 mM Na₂HPO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄); 1 ml β -Mercaptoethanol; 100 μ l 10 % (w/v) SDS) und 40 μ l Chloroform für ca. 5 min aufgeschlossen. Anschließend wurden 20 μ l einer ONPG-Lösung (4 mg/ml in Puffer Z) zu den aufgeschlossenen Zellen gegeben und sofort die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität am *Microplate Reader* (Modell 3550 *Microplate reader*, Biorad, München) begonnen. Die eingestellten Parameter waren die folgenden: Wellenlänge 415 nm, Intervall 13 s und 80 Wiederholungen. Unter Einbezug der optischen Dichte zum Zeitpunkt der Zellernte konnte die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität in Miller Units bestimmt werden.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung von genomischer DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *E. coli* wurden 5 ml Kultur mit dem *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

Isolierung von Plasmid-DNA (Birnboim & Doly, 1979)

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem *illustra plasmidPrep Mini spin kit* (GE Healthcare, Freiburg).

2.4.2 Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA erfolgte nach (Sambrook *et al.*, 1989) in 1%igen Agarosegelen in TAE- Puffer (40 mM Tris/Acetat, pH 8,0; 1 mM EDTA). Die Proben wurden vor dem Lauf mit 0,2 Vol. Stopp- Lösung (0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 40 % (w/v) Glycerin) versetzt und die Auftrennung erfolgte bei 90 V in horizontalen Elektrophoresekammern (Peqlab, Erlangen). Anschließend wurde das Gel 20-30 min in Ethidiumbromid (1 µg/ml in H₂O_{dest.}) inkubiert und kurz mit Wasser gespült. Die Visualisierung und Dokumentation der Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines Image MastersTM VDS (TFX-20.M, MWG-Biotech, Ebersberg). Dadurch konnte die DNA visualisiert und fotografiert werden.

2.4.3 Größenstandard

Die annähernde Größe linearer DNA-Fragmente wurde durch direkten Vergleich mit elektrophoretisch aufgetrennten Molekülen definierter Größe (Marker) bestimmt. Zum Einsatz kam dabei folgender Standard:

λ-DNA/PstI-verdaut:

14,06 / 11,50 / 5,08 / 4,75 / 4,51 / 2,84 / 2,56 / 2,46 / 2,44 / 2,14 / 1,99 / 1,70 / 1,16 / 1,09 / 0,81 / 0,51 / 0,47 / 0,45 / 0,34 / 0,26 / 0,25 kb

2.4.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration gereinigter PCR Fragmente, isolierter Plasmid DNA, sowie von isolierter genomischer DNA wurde vom Nanodrop 1000 (Peqlab, Erlangen) anhand der Absorption bei 260 nm ermittelt. Die Reinheit der Probe wird durch das Verhältnis A260:A280 kontrolliert. Dieser Wert gibt das Verhältnis von DNA und Protein an und sollte idealerweise zwischen 1,8 und 1,9 liegen.

2.4.5 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Entfernung von Primern, Salzen und Proteinen aus PCR-Produkten wurden die Ansätze unter Anwendung des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

2.4.6 Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

PCR-Produkte und Plasmide wurden mit Hilfe des *QIAquick[®] Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen isoliert.

2.4.7 Verdau von DNA-Fragmenten und Vektoren mit Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltung von DNA erfolgte ein Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen über Nacht. Die Temperatur und der verwendete Puffer wurden dabei entsprechend dem Enzym gewählt. Nach dem Verdau wurden die Restriktionsendonukleasen hitzedenaturiert und die DNA nach 1.4.4 bzw. 1.4.5 gereinigt.

2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten und Mikrodialyse

Die Reaktionen wurden in einem 20 µl Ligationsansatz durchgeführt. Für die Ligation von spezifischen DNA-Fragmenten in einen linearisierten Vektor wurden die Fragmente sowie der Vektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen gespalten, um kohäsive Enden für die Ligation zu erzeugen. Für die Ligationsreaktion wurde ein Vektor:DNA-Verhältnis von 1:6 eingesetzt. Zunächst wurden Vektor und DNA-Fragment gemischt, für 5-10 min bei 45 °C inkubiert und anschließend für 2-3 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden dem Ansatz 2 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) zugefügt. Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht mit einem Gradienten von 30 – 4 °C. Anschließend wurde die Ligase hitzedenaturiert und der Ligationsansatz für 30 min auf einem Membranfilter (Porengröße 0,025 µm; Millipore GmbH; Eschborn) gegen H₂O_{dest} mikrodialysiert (Marusyk & Sergeant, 1980).

2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.5.1 Standard PCR

Zur Amplifizierung von PCR Produkten wurden verschiedene Polymerasen verwendet. Die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Frankfurt), welche eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*proof-reading*) besitzt, wurde für Amplifikate genutzt, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten. Für analytische Zwecke (z.B. Kontrolle von korrekten Ligationen, Kolonie-PCR) wurde die *Dream-Taq* DNA-Polymerase (Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. In Tabelle ist die Zusammensetzung einer Standard PCR gezeigt.

Tabelle 6 Zusammensetzung des PCR Ansatzes

Komponenten	PCR-Ansatz
Primer	30 pmol
dNTPs	0,1 mM
Puffer	1 x
Polymerase	1 U
<i>template</i> DNA	50 ng
ad H ₂ O _{dest}	50 µl

Zur Überprüfung positiver Klone wurde eine Kolonie in 30 µl H₂O_{dest} resuspendiert und zum Aufschluss der Zellen für 10 min bei 95 °C inkubiert. Der gesamte resuspendierte Ansatz wurde als *template* eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 12 (Anhang) aufgelistet.

Die PCR wurde im Thermocycler T 3000 (Biometra, Göttingen) mit folgenden Programmen durchgeführt.

<i>Dream Taq</i> -DNA-Polymerase :	Denaturierung:	5 min	95 °C	} 34 x
	Denaturierung:	30 s	95 °C	
	<i>Annealing</i> :	30 s	T _m -5 °C	
	<i>Extension</i> :	XXX	72 °C	
	Pause:		4 °C	

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase:	Denaturierung:	2 min	95 °C	} 10 x
	Denaturierung:	30 s	95 °C	
	<i>Annealing</i> :	30 s	T _m -8 °C	
	<i>Extension</i> :	XXX	72 °C	} 24 x
	Denaturierung:	30 s	95 °C	
	<i>Annealing</i> :	30 s	T _m -5 °C	
	<i>Extension</i> :	XXX	72 °C	
	Pause:		4 °C	

Die *Extension*-Zeit berechnete sich aus der Länge des zu erwartenden Fragments. Für die *Dream Taq*-DNA-Polymerase wurden 60 s pro 1 kb des zu amplifizierenden Fragments und für die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase 30 s pro 1 kb gewählt. Die *Annealing* Temperatur (T_m) berechnete sich aus folgender Formel (Bertram & Gassen, 1991).

$$T_m = 2 \text{ °C} \times \text{Anzahl der A/T-Paare} + 4 \text{ °C} \times \text{Anzahl der G/C-Paare}$$

2.6 Herstellung und Selektion rekombinanter *E. coli* Klone

2.6.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 200 ml LB-Medium (je nach Stamm erfolgte die Zugabe von Antibiotika) 1%ig von einer Vorkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,5 – 0,8 angezogen. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min bei 2990 g (4 °C) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit je 200 ml eiskaltem H_2O_{dest} und einmal mit 30 ml 10%igem (w/v) Glycerin gewaschen. Das gereinigte Zellpellet wurde in 0,5-0,8 ml 10%igen Glycerin aufgenommen und als 40 µl Aliquots bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.6.2 Transformation durch Elektroporation (Dower et al., 1988)

Für den Ansatz wurden 40 µl kompetente Zellen mit 2-5 µl entsalztem Ligationsansatz (2.4.8) versetzt. Nach 1 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen in eine sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω in einem Gene Pulser™ (Bio-Rad, München). Es wurde eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und Zeitkonstanten von circa 4,0 ms erreicht. Sofort nach dem Impuls wurde zu den Zellen 0,8 ml vorgewärmtes LB-Medium gegeben und die Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte das Ausplattieren der Zellen auf selektivem Nähragar und anschließend eine Inkubation für ca. 12 h bei 37 °C.

2.6.3 Herstellung $CaCl_2$ ultra-kompetenter Zellen

Zur Herstellung ultra-kompetenter Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur 1%ig beimpft und das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt. Die Kultur wurde bis zu einer OD_{600} von ca. 0,5 bei 37 °C schüttelnd inkubiert und anschließend in sterilen Röhrchen bei 2990 g für 30 min bei 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 16 ml eiskaltem Transformationspuffer (50 mM $MnCl_2$, 20 mM $CaCl_2$,

250 mM KCl, 2 % (v/v) 0,5 M PIPES pH 6,7) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend unter Zugabe von 0,3 ml sterilen DMSO in 4 ml eiskaltem Transformationspuffer gelöst und 10 min auf Eis inkubiert. 200 µl der Zellsuspension wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

2.6.4 Transformation in chemokompetente Zellen

Die bei -80 °C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zu 200 µl Zellsuspension erfolgte die Zugabe von 4 µl Ligationsansatz (2.4.8) bzw. 2 µl gereinigtem Plasmid. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis, schloss sich ein 90 sekündiger Hitzeschock bei 42 °C an. Der Ansatz wurde sofort für 2 min auf Eis abgekühlt, wodurch sich die Membranpermeabilität deutlich erhöhte. Dem Ansatz wurden nun 800 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugefügt und die Zellen wurden 45 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Zwei verschiedene Volumina (z.B. 100 µl und 200 µl) wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.6.1 Quick Check Gel zur Überprüfung von Transformanten

Um zu überprüfen, ob die Klone das gewünschte Plasmid enthielten, wurden zunächst 100 µl Übernachtskultur mit 20 µl DNA Ladepuffer und 50 µl Phenol-Chloroform (1:1) (untere Phase) vermischt. Anschließend wurde die Probe gemischt und 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Ein Aliquot (20 µl) des Überstandes wurde mittels Agarosegelelektrophorese (1%iges Gel) analysiert. Die obersten Banden im Gel repräsentieren die chromosomale DNA. Nachfolgend waren die Plasmide, sowie die ribosomale RNA sichtbar sein.

2.6.2 DNA-Sequenzierung und Auswertung

Sequenzier-Reaktionen wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) nach dem Prinzip von (Sanger *et al.*, 1992) durchgeführt. Hierzu wurden 50 – 200 ng DNA eingesetzt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit dem Computerprogramm 4Peaks (Version 1.7.2. Mek&Tosj). Mit Hilfe des Programms BLAST (*basic local alignment search tool*) wurden über die „National Center for Biotechnological Information“- Webseite (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) die abgeleiteten Aminosäuresequenzen klonierter DNA-Fragmente mit den gespeicherten DNA- bzw. Proteinsequenzen der Datenbanken EMBL und SwissProt (Stand September 2007) verglichen. Die Bestimmung des theoretischen Molekularmasse und des isoelektrischen Punktes der synthetisierten Proteine erfolgte mit dem Programm Compute pI/Mw des „ExPASy Proteomics Server“ (<http://www.expasy.com>).

2.6.3 Gerichtete Mutagenese

Zur Analyse der Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Funktionalität von Proteinen wurde das Prinzip der gerichteten Mutagenese genutzt (Zoller & Smith, 1982). Hierbei wurden einzelne Basen so verändert, dass nach der Translation ein Aminosäureaustausch stattfand. Die PCR wurde an einem Plasmid durchgeführt, welches das zu mutierende Gen, enthielt. Mit Hilfe von synthetischen Primern, welche die Veränderung mittig enthielten, erfolgte eine *in vitro* Neusynthese des Plasmids mit gewünschtem Austausch.

Die Durchführung der Mutagenese erfolgte mit dem *QuikChange Site-directed mutagenesis kit* der Firma Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Die verwendeten Primer sind im Anhang (Tab. 12) zusammengefasst und die PCR wurde im *Thermocycler T 3000* (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Der erfolgreiche veränderte Basenabfolge wurde mittels Sequenzierung (1.6.2) bestätigt.

2.7 Proteinchemische Methoden

2.7.1 Zellaufschluss und Fraktionierung

Das geerntete Zellpellet (2.3.4) wurde in 3 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 170 mM NaCl) je 1 g Zellmasse resuspendiert. Pro 1 ml Zellsuspension wurden 1 mg Lysozym, 0,1 μ M PMSF und 5 μ g/ml DNase hinzugefügt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall (SONOPLUS Ultraschall-Homogenisator Bandelin, Berlin). Dafür wurden folgende Parameter gewählt: Sonotrodentyp KE76, 30 Watt, 3 Zyklen a 4 min, Beschallung in 0,5 s Intervallen. Zur Sedimentierung der Zelltrümmer und nicht aufgeschlossener Zellen erfolgte eine Zentrifugation bei 43150 g für 45 min bei 4 °C. Der entstandene Überstand wurde im Folgenden als Rohextrakt bezeichnet. Zur weiteren Fraktionierung wurde der Rohextrakt bei 105907 g für 45 min und 4 °C (Sorvall Discovery M120 SE, AT4, Kendro, Osterode) zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun alle cytoplasmatischen Proteine und dieser wurde fortan als lösliche Fraktion (LF) bezeichnet. Das entstandene Pellet entsprach der Membranfraktion (MF), da es alle integralen Membranproteine, sowie die an die Membran assoziierten Proteine enthielt. Zur Entfernung eventueller Verunreinigungen der Membranfraktion wurde diese zweimal mit 100 mM Tris/HCl pH 7,4 gewaschen. Membranfraktionen aus 1 l anaerober Anzucht wurden in 300 μ l Puffer W (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert. Membranfraktionen, welche zur Proteinreinigung eingesetzt werden sollten, wurden in 3 ml Puffer W pro 1 l aerober Anzucht resuspendiert. Die Fraktionen wurden bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert.

2.7.2 Solubilisierung von Membranen

Um integrale Membranproteine mittels Affinitätschromatografie reinigen zu können, müssen diese zunächst aus der Membran gelöst werden. Dazu wurden der Membranfraktion (2.7.1) 15 mM n-Dodecylmaltosid (DDM, Glycon, Luckenwalde) zugegeben. Bei DDM handelt es sich um ein Detergenz mit sehr milden Eigenschaften, einer nicht-ionischen Ladung mit Maltoserest und einer kritischen Micellkonzentration von 0,16 mM. Die Solubilisierung erfolgte über Nacht bei 4 °C im Rotationsschüttler. Zur Abtrennung von nicht solubilisierten Proteinen und restlichen Membranbestandteilen erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (105907 g, 1 h, 4 °C). Der erhaltene Überstand konnte nun zur Reinigung eingesetzt werden.

2.7.3 Reinigung von *Strep*-tag-II Fusionsproteinen

Die Aufreinigung der *Strep*-tag II Fusionsproteine erfolgte durch Affinitätschromatografie an *Strep*-Tactin-Sepharose Material (IBA Biotagnologies, Göttingen). Die Fraktionen wurden vor der Nutzung mit Avidin (24 µl einer 2 mg/ml Stammlösung) behandelt. Dies dient zur Maskierung von Biotin, da dieses sonst irreversibel an das Affinitätsmaterial bindet. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Eine Polypropylen-Säule (Qiagen, Hilden) wurde mit 2 ml *Strep*-Tactin-Sepharose (50 %) befüllt, um so ein Säulenvolumen von 1 ml zu erreichen. Nach Äquilibration der Säule mit 3 x 2 ml Puffer W⁺ (Puffer W + 2 mM DDM) wurde die zu reinigende Fraktion aufgetragen. Alle nicht gebundenen Proteine wurden durch Waschen mit 6 x 1 ml Puffer W⁺ entfernt. Die Elution der gebundenen rekombinanten Proteine erfolgte fraktioniert mit 6 x 0,5 ml Elutionspuffer (Puffer W⁺ + 2,5 mM α-Desthiobiotin). Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 3 x 5 ml Regenerationspuffer (Puffer W + 1 mM 4'-Hydroxyazobenzol-2-carbonsäure (HABA)) und 2 x 4 ml Puffer W gewaschen. Somit war ein mehrmaliges Verwenden der Säule möglich. Zur langfristigen Lagerung der Säulen wurden diese nach der Regenerierung mit 5 Vol. H₂O_{dest} gespült und mit 20 % Ethanol äquilibriert. Der gesamte Versuch wurde manuell durchgeführt.

2.7.4 Reinigung von Proteinen mit 6 x His-tag

Die Reinigung von Proteinen mittels His-tag erfolgte nach dem IMAC-Verfahren (*immobilized metal affinity chromatography*). Hierfür wurde eine His Trap FF *crude* Säule (GE Healthcare, München) mit einem Säulenvolumen von 1 ml verwendet. Die angeschlossene Pumpe erzeugte eine Flussrate von 0,5 ml/min. Vor der Auftragung der Fraktion auf die Säule wurde diese mit 10 Vol. Bindepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl) äquilibriert. Anschließend wurde die zu reinigende Fraktion aufgetragen und mit 10 Vol. Bindepuffer gewaschen. Unspezifische, an die Säule gebundene, Proteine wurden mittels eines ansteigenden Imidazol Stufengradienten (Bindepuffer + 5 mM, 10 mM bzw. 30 mM Imidazol, je 4 Vol.) entfernt. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von 4 Vol. Elutionspuffer (Bindepuffer + 300 mM Imidazol). Zur Wiederverwendung der Säule schlossen sich folgende Waschschrte an: 10 Vol. *Stripping* Puffer (20 mM Natriumphosphat pH 7,4, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA), 10 Vol. Bindepuffer und 10 Vol. H₂O_{dest.} Zur Regeneration wurde die Säule mit 0,5 Vol. 0,1 M NiSO₄ beladen. Zur Lagerung wurde die Säule mit H₂O_{dest.} gewaschen und auf 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

2.7.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

2.7.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 20 µl der Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz (0,007 % (w/v) Serva Blau G-250; 5 % (v/v) Ethanol; 8,5 % (v/v) H₃PO₄) gemischt, 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend wurde die Absorption bei 595 nm mit einem UV/VIS Spektralphotometer (Uvikon 900, Double Beam UV/VIS Spektralphotometer, Kontron Instruments, Rossdorf) in einer 1 ml Küvette gemessen. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte anhand einer linearen Eichgerade, die mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 1-10 µg / 20 µl Probe erstellt wurde.

2.7.5.2 Proteinbestimmung bei 280 nm mit Hilfe des Nanodrops

Mit Hilfe des Nanodrops wurde die relative Proteinkonzentration von Proteinlösungen bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Zudem konnte unter Verwendung des spezifischen Extinktionskoeffizienten und der errechneten Molekularmasse (*ExPASy Proteomics*, Online Programm), die Konzentration von gereinigten Proteinen bestimmt werden. Für FocA_{Strep} wurden folgende Parameter verwendet:

Molekularmasse:	32,03 kDa
Extinktionskoeffizient:	56170 M ⁻¹ cm ⁻¹

2.7.5.3 Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

Zwischen 20 und 50 µl einer Proteinlösung wurden in einer 1 ml Küvette mit H₂O_{dest.} auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt, mit 1 ml Lösung C gemischt und der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Dem Ansatz wurde 150 µl Lösung D zugesetzt und anschließend alles gemischt. Nach erneuter Inkubation für 30 min bei RT im Dunkeln folgte die Extinktionsmessung im Uvikon bei 750 nm. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration diente eine lineare Eichgerade, die parallel mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 5-50 µg Protein erstellt wurde.

Lösung A

Na ₂ CO ₃ (w/v)	2 %
Natriumtartrat (w/v)	0,5 %
NaOH	1 N

Lösung B

CuSO ₄ x 5 H ₂ O (w/v)	0,1 %
--	-------

Lösung C

Lösung A (v/v)	89,5 %
Lösung B (v/v)	10 %
SDS (w/v)	0,5 %

Lösung D

Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz (Fluka, Steinheim) (v/v)	50 %
--	------

2.7.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung von Proteinen wurden diese auf 10-12,5%ige SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in vertikalen Mini- bzw. Midigel Apparaturen (Biometra, Göttingen) in SDS-Laufpuffer. Nach Angaben des Herstellers wurden das Sammelgel und das Trenngel vorbereitet (Zusammensetzung siehe Tab. 7). Die Proben wurden mit 0,5 Vol. 5 x SDS-Probenpuffer bzw. 5 x Membran-Probenpuffer versetzt und nach Denaturierung (5 x SDS-Probenpuffer 10 min, 95 °C) bzw. 1 h bei RT (5 x Membran-Probenpuffer) bei 25 mA im Gel aufgetrennt. Als Größenstandard diente der PageRuler Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

Tabelle 7 Zusammensetzung eines SDS-Gels und dessen Puffer

Lösung	Inhaltsstoffe
Sammelgel	5 % (w/v) Acrylamid (37,5:1) 125 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS
Trenngel	10-12,5 % (w/v) Acrylamid (37,5:1) 376 mM Tris/HCl, pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
5 x SDS-Probenpuffer	315 mM Tris/HCl, pH 6,8 10 % (w/v) SDS 50 % Glycerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 25 % (v/v) β - Mercaptoethanol
5 x Membran-Probenpuffer	160 mM Tris/HCl pH 6,8 25 % (v/v) Glycerin 0,025 % (w/v) Bromphenolblau 25 mM DTT 5 % (w/v) SDS

2.7.7 *Blue-Native* Elektrophorese

Die *Blue-Native* Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-Page) wurde ursprünglich von Hermann Schägger zur Isolierung von Membranproteinkomplexen aus Mitochondrien entwickelt, jedoch nimmt sie heute eine wichtige Rolle in der biologischen und biochemischen Untersuchung von Membranproteinkomplexen ein (Schägger & Jagow, 1991). Durch die Zugabe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,01%) zum Kathodenpuffer erhalten die eigentlich hydrophoben Proteine eine negative Ladung und werden wasserlöslich. Durch die negative Ladung wandern die Proteine zur Anode, wobei die Wandereigenschaften von Ladung, Größe und Form der Proteine beeinflusst werden. Für die BN-Page wurde 5-15%ige Gradientengele verwendet. Die Proteinproben wurden mit 10 x Probenpuffer gemischt und auf das Gel geladen, wobei zunächst mit Coomassie versetzter Kathodenpuffer für den Lauf verwendet wurde. Nachdem die Coomassie Lauffront die Hälfte des Gels erreicht hatte, wurde der Coomassie-freie Kathodenpuffer benutzt. Die Zusammensetzung der Gele und aller verwendeten Puffer ist in Tab. 8 dargestellt.

Tabelle 8 Zusammensetzung eines BN-Gels und dessen Puffer

Lösung	Inhaltsstoffe
Natives Sammelgel	4 % Acrylamid:Bisacrylamid (49,5:1,5) 50 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0 0,5 M 6-Aminocaprinsäure 0,2 % TEMED 0,05 % Ammoniumpersulfat
Natives Trenngel	5-15 % Acrylamid:Bisacrylamid (49,5:1,5) 50 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0 0,5 M 6-Aminocaprinsäure 5-20 % Glycerin 0,1 % TEMED 0,025 % Ammoniumpersulfat
Kathodenpuffer	50 mM Tricin 15 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,0
Anodenpuffer	50 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,0
10 x Probenpuffer	5 % Coomassie Brilliant Blue G-250 100 mM Bis-Tris/HCl; pH 7,0 500 mM 6-Aminocaprinsäure 30 % Saccharose

2.7.8 Färbung von Proteinen

2.7.8.1 Coomassie Färbung (Weber & Osborn, 1969)

Das Gel wurde zur Anfärbung der Proteine 30-60 min in Coomassie-Färbelösung (0,2 % (w/v) Serva Blau R 250; 0,05 % (w/v) Serva Blau G 250; 5 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 42,5 % (v/v) Ethanol) geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure; 45 % (v/v) Ethanol) inkubiert bis die Banden die gewünschte Farbintensität zeigten.

2.7.8.2 Coomassie Blue Silver Färbung (Kolloidal Färbung)

Eine weitere Methode zur Färbung von SDS-Gelen stellt die Coomassie Blue Silver Methode dar. Dazu werden 2 % der Färbelösung A (5 % (w/v) Coomassie G 250) und 98 % der Färbelösung B (2 % (v/v) ortho Phosphorsäure; 10 % (w/v) Ammoniumsulfat) gemischt und mindestens 4 h gerührt. Das SDS-Gel wird nach der Elektrophorese 1 h in Fixierlösung (40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) geschwenkt, mit H₂O gewaschen und anschließend über Nacht in der Färbelösung geschwenkt.

2.7.9 Western-Blot Analyse

Nach elektrophoretischer Auftrennung von Proteinen wurden diese mit Hilfe einer *semi dry* Fastblot B34-Apparatur (Biometra) auf eine Nitrocellulosemembran (Machery & Nagel, Düren) transferiert. Hierfür wurden die Gele und die zugeschnittene Nitrocellulosemembran zunächst 10 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris; 0,015 M Glycin; 20 % (v/v) Methanol) geschwenkt. Anschließend wurde von der Anode aus folgende Schichtung luftblasenfrei vorgenommen: 3 Lagen Towbin-Puffer-getränktes Whatman-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel), Nitrocellulosemembran, Polyacrylamidgel, 3 Lagen getränktes Whatman-Papier. Der Transfer erfolgte für 90 min und 1,2 mA pro cm² Membranfläche.

2.7.10 Proteindetektion mittels ECL-Reaktion (*Enhanced Chemiluminescence*)

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen vor der Detektion wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Transfer der Proteine für mindestens 1 h oder über Nacht in 1 x PBS (4 mM KH₂PO₄; 16 mM Na₂HPO₄; 115 mM NaCl) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in 1 x PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation über Nacht mit dem primären Protein spezifischen Antikörper (AK) in 1 x PBS + 0,5 % (w/v) BSA an. Um ungebundene AK zu entfernen, wurde die Membran im Anschluss 3 x 15 min mit 1 x PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären AK (1: 5000 in 1 x PBS + 0,5 % (w/v) BSA; *goat-anti-rabbit* IgG (H+L)-HRP Konjugat, Biorad, München) für 1 h. Danach schloss sich ein Waschschrift für 3 x 15 min mit 1 x PBS an. Das IgG (H+L)-HRP Konjugat ist mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Somit erfolgte die Detektion der Proteine indirekt durch die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H₂O₂ zu einem lichtemittierenden Produkt. Für die Reaktion wurden Lösung A (100 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 % (v/v) 250 mM Luminol (Fluka, Steinheim) in DMSO; 0,5 % 90 mM *p*-Coumarsäure (Fluka, Steinheim) in DMSO) und Lösung B (100 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,018 % (v/v) H₂O₂) im Dunkeln miteinander vermischt und die geblottete Membran für 1 min darin geschwenkt. Nach dem Auflegen eines Röntgenfilms (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche Diagnostics, Mannheim) wurde dieser abhängig von den zu erwartenden Detektionssignalen exponiert. Zur Entwicklung wurde der Röntgenfilm für 1-2 min in Entwicklerlösung (Calbe Fotochemie, Calbe) geschwenkt, mit Wasser gespült und in Fixierlösung (Calbe Fotochemie, Calbe) für ebenfalls 1-2 min belassen.

2.7.11 Antikörper-Stripping der Nitrocellulosemembran

Für eine zweite Detektion mit einem primären Protein-spezifischen AK mussten zunächst bereits gebundene Primär- und Sekundärantikörper durch „*Mild Stripping*“ entfernt werden. Dazu wurde die Membran zunächst kurz in 1 x PBS getränkt und anschließend nacheinander 2 x 10 min in *Mild Stripping*-Puffer (0,2 M Glycin; pH 2,2; 0,1 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) Tween) und 2 x 10 min in 1 x PBS gewaschen. Zum Nachweis des erfolgreichen *Stripping* wurde eine „Blinddetektion“ durchgeführt, um sicher zu gehen das der komplette AK der ersten Detektion abgewaschen wurde und keine Signale mehr detektiert werden können. Vor der erneuten Inkubation mit einem Antikörper wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation in 1 x PBS + 5 % (w/v) Magermilchpulver blockiert.

2.7.12 Herstellung und Reinigung von Antikörpern

Zur Verbesserung der Detektion des FocA Proteins in Western-Blot Analysen wurden polyklonale AK gegen das Protein FocA aus *E. coli* nach dem 3 Monate Standard-Immunisierungsschema (Seqlab, Göttingen) im Kaninchen hergestellt werden. Die auf diese Weise gewonnenen AK wurden mit Hilfe des *AminoLink Coupling Gel Kits* der Firma PIERCE Biotechnology (Rockford, USA) gereinigt. Die Reinigung erfolgte über die reversible und spezifische Bindung der AK an das vorher an die Säulenmatrix kovalent gebundene FocA mit N-terminalen *Strep-tag*, wobei das Säulenvolumen 1 ml betrug. Die Immobilisierung von FocA erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Hierzu wurden 10 ml des zu reinigenden AK-Serums filtriert und mit 20 ml 1 x PBS-Puffer verdünnt. Die Säule wurde mit 10 ml Waschpuffer 1 (1 M Tris-HCl; 50 µl NaCNBH₃ (5 M NaCNBH₃ in 1 N NaOH)) für 30 min gewaschen. Abschließend wurde das verdünnte Serum auf die Säule gegeben und mit der Matrix über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Durchlauf aufgefangen und es erfolgten mehrere Waschschrte mit je 10 ml 1 x PBS, Waschpuffer 2 (50 mM Tris/HCl; pH 8,0; 0,1 % Triton (w/v); 0,5 M NaCl), Waschpuffer 3 (50 mM Tris/HCl; pH 9,0; 0,1 % Triton (w/v); 0,5 M NaCl) und Waschpuffer 4 (50 mM Na-Phosphat-Puffer; pH 6,3; 0,1% Triton (w/v); 0,5 M NaCl). Die Elution erfolgte mit 10 ml Elutionspuffer (50 mM Glycin/HCl; pH 2,5, 0,1 % (w/v) Triton, 0,15 M NaCl) in 1 ml Fraktionen. Zur Neutralisierung des pH-Wertes wurde in den Reaktionsgefäßen 100 µl Neutralisationspuffer (1 M Tris/HCl; pH 9,0) vorgelegt. Zur Regeneration der Säule wurde diese mit 20 ml 1 x PBS-Puffer gewaschen und anschließend bei 4 °C gelagert. Zur Kontrolle der Reinigung wurde jeweils 10 µl der Wasch- und Elutionsfraktionen in einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Nach Auftragung des Serums auf die Matrix wurden alle Schritte bei 4 °C durchgeführt.

2.7.13 *Far Western-Analyse*

Als eine Möglichkeit zur Bestimmung der Interaktionen zwischen 2 gereinigten Proteinen eignet sich die *Far Western*-Methode. Diese Methode basiert auf dem schon beschriebenen Western Blotting. Während bei klassischen Western-Blot Verfahren ein AK an das Protein von Interesse bindet, bindet bei *Far Western*-Analysen ein gereinigtes Protein, welches kein Antikörper ist. Zunächst erfolgt der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wie unter 2.7.9 beschrieben. Das Blockieren der Membran erfolgte mit 5 % Milchpulver (w/v) über Nacht. Nach 3 maligen Waschen der Membran in 1 x PBS wird diese über Nacht mit dem gereinigten Protein inkubiert (500 µg gereinigtes Protein; 0,5 % BSA gelöst in 20 ml 1 x PBS). Anschließend wurde die Membran 3 mal in 1 x PBS gewaschen und über Nacht mit dem primären AK (gerichtet gegen das Protein, welches in Lösung auf die Membran gegeben wurde) inkubiert. Im Folgenden wurde die Membran gewaschen (3 mal mit 1 x PBS) und der sekundäre AK für eine Stunde auf die Membran gegeben. Zur Detektion einer möglichen Interaktion wurde der Blot mittels ECL-Reaktion (2.7.10) entwickelt.

2.7.14 *Circulardichroismus (Kelly et al., 2005)*

Zur Ermittlung des Anteils an Sekundärstrukturelementen (z.B. der Anteil an α -Helices, β -Faltblättern oder *random coils*) in Proteinen, eignet sich die Methode der Circulardichroismus (CD) Spektroskopie. Da die Reinheit der im Puffer enthaltenen Inhaltsstoffe wichtig für die Messung ist, wurden die Proteine zunächst mittels einer PD 10 Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) umgepuffert (20 mM Tris/HCl (Gerbu, Gaiberg), pH 8,0; 150 mM NaCl (Merck, Darmstadt; 0,2 mM EDTA (Gerbu, Gaiberg); 1 mM DDM) und mit Hilfe eines Centrikon-Röhrchens (Vivaspin 6, Membran 10000, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) aufkonzentriert. Fern-UV-CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 190-260 nm in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 0,01 cm aufgenommen. Die Messung erfolgte in einem J-810 Spektrofotometer (Jasco Labor- und Datentechnik, Gross Umstadt) bei 20 °C, einer Geschwindigkeit von 1 nm/s und einer Glättung von 1 s. Alle Messungen wurden 50 fach akkumuliert und pufferkorrigiert. Die gemessene Elliptizität wurde anhand der Gleichung 1 in die molare Elliptizität umgerechnet.

Gleichung 1 Berechnung der molaren Elliptizität

$$[\Theta] = \frac{\Theta \times Mr}{c \times d \times 10}$$

- [Θ] = molare Elliptizität in $\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$
 Θ = gemessene Elliptizität in mdeg
 Mr = Molekulargewicht in g/mol
 c = Proteinkonzentration in mg/ml
 d = Schichtdicke der Küvette in cm

2.7.15 Pull-down Analyse

Zum Nachweis einer Interaktion zwischen zwei Proteinen kann die *Pull-down* Analyse genutzt werden. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Methoden unterscheiden sich sowohl in der Art der genutzten *beads*, als auch im Prinzip. Alle *Pull-down* Analysen wurden bei 4 °C durchgeführt.

2.7.15.1 Pull-down Analyse mittels Streptactin-coated magnetic beads

Für die Verwendung dieser Methode ist es notwendig, dass einer der Interaktionspartner einen *Strep*-tag besitzt. Die Immobilisierung des Fusionsproteins erfolgt für 1 h auf dem Rotationsschüttler nach Zugabe von 20 μg gereinigtem Protein auf 2 mg Streptactin-coated *magnetic beads* type II (IBA Biotagnologies, Göttingen). Anschließend wurden die *beads* nach Anlegung eines magnetischen Feldes 5 x mit 500 μl Puffer W (2.7.3) gewaschen. Nach Zugabe von 10 μg *Strep-tag* freien Protein bzw. 100 μg löslicher Fraktion wurden diese erneut 1 h im Rotationsschüttler inkubiert. Nach Ende der Inkubation schlossen sich 10 Waschschrte mit je 500 μl Puffer W an. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit 50 μl Elutionspuffer (Puffer W + 2,5 mM α -Desthiobiotin) für 30 min im Rotationsschüttler. Je 25 μl der Elutionsfraktionen wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel (1.7.6) aufgetragen.

2.7.15.2 Pull-down Analyse mittels Protein A-coated magnetic beads

Diese Methode basiert auf dem Einsatz eines spezifischen Antikörpers gegen einen Interaktionspartner und bietet den Vorteil, dass keiner der Interaktionspartner einen Fusions-tag besitzen muss. Dabei bindet der spezifische Antikörper an ein Protein und im Fall einer Interaktion sollte ein Komplex aus Antikörper und beider Interaktionspartner an den Protein A-coated *magnetic beads* (NEB, Frankfurt am Main) gebunden sein. Hierzu wurden 100 μg gereinigte Membranfraktion (1.7.1) mit 18 mM DDM für 1 h bei 4 °C im Rotationsschüttler solubilisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 μl anti-PfIB-Antikörper zum Ansatz, welcher anschließend 30 min bei 4 °C über Kopf geschüttelt wurde.

Protein A-coated magnetic beads (25 μ l) wurden mit 500 μ l Bindepuffer (0,1 M Kaliumphosphatpuffer; pH 8,0) gewaschen und wurden zusammen mit 80 μ l Bindepuffer zum Ansatz gegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4 °C im Rotationsschüttler. Im magnetischen Feld wurde der Ansatz 3 mal mit Bindepuffer gewaschen, anschließend mit 50 μ l 0,2 M Glycin (pH 2,5) versetzt, gemischt und 5 min bei 4 °C invertiert. Die Elution erfolgte im magnetischen Feld nach Zugabe von 10 μ l 1 M Tris/HCl (pH 9,0) und 25 μ l der Elution wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel (1.7.6) aufgetragen. Der Nachweis erfolgte im Western Blot (1.7.9) mit Antikörpern gegen den 2. Interaktionspartner. Für die Verifizierung einer Interaktion zwischen 2 gereinigten Proteinen wurden anstatt der Membranfraktion 10 μ g gereinigtes FocA, 5 μ g gereinigtes PflB, sowie FocA-spezifischer Antikörper vermischt und zu den Protein A coated magnetic beads hinzugegeben.

2.7.16 Bacterial-Two-Hybrid-(BACTH) System

Als weitere unabhängige Methode zu den *in vitro* Interaktionsstudien sollte nun das Prinzip des *Bacterial Two Hybrid* Systems genutzt werden. Dieses System stellt eine schnelle und effiziente Möglichkeit dar, Heterodimerisierung von Proteinen *in vivo* zu detektieren. In dieser Arbeit wurde das BACTH (*Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid*) System der Firma Euromedex (Souffelweyersheim, Frankreich) genutzt. Das System wurde von der Gruppe von Dr. D. Ladant (Pasteur Institut Paris) entwickelt und basiert auf der Interaktions-vermittelten Wiederherstellung der Adenylat Cyclase Aktivität in *cya*⁻ *E. coli* Stämmen (Karimova *et al.*, 1998; 2000). Das Prinzip ist in Abb. 6 dargestellt.

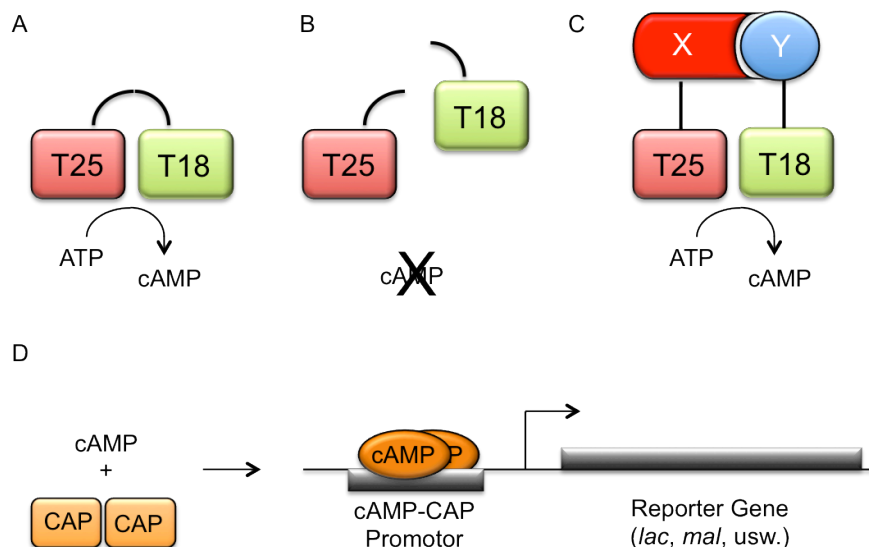


Abb. 6 Darstellung der Funktionsweise des BACTH Systems
modifiziert nach Karimova *et al.* 1998

Dabei wurde sich die Tatsache zu Nutze gemacht, dass die Adenylat Cyclase (CyaA) aus *Bordetella pertussis* aus zwei Teilen (T25 und T18) besteht (Abbildung 6A) und nicht aktiv ist wenn diese beiden Teile physisch voneinander getrennt sind (Ladant & Ullmann, 1999) (Abbildung 6B). Werden diese Fragmente allerdings an interagierende Polypeptide (X und Y) fusioniert, führt die Heterodimerisierung dieser Fragment dazu, dass T25 und T18 wieder in räumliche Nähe gelangen und wieder funktionsfähig sind (Abbildung 6C). Diese Komplementation resultiert in der Synthese von cAMP. Das produzierte cAMP kann an das katabolische Aktivator Protein (CAP) binden, welches nun in der Lage ist als Regulator die Transkription in *E. coli* zu beeinflussen. Durch die Bindung des Regulator wird u. a. die Expression verschiedener Resistenz-Gene induziert, sowie die Gene des *lac* und *mal* Operons, deren Genprodukte im Laktose und Maltose Katabolismus eine wichtige Rolle spielen (Abbildung 6D). Somit können die Zellen Laktose bzw. Maltose als Kohlenstoffquelle nutzen und diese Umsetzung kann auf Indikator- bzw. Selektivmedien nachgewiesen werden. Zudem kann mit der Messung der β -Galaktosidase-Aktivität indirekt die Menge an gebildeten cAMP bestimmt werden und somit eine Aussage über eine mögliche Interaktion getroffen werden.

Dazu wurden die Gene der zu untersuchenden Proteine in die entsprechenden Vektoren kloniert (2.5 und 2.4) und in den Stamm DHM1 co-transformiert (2.6). Anschließend wurde die β -Galaktosidase-Aktivität der Stämme ermittelt.

2.8 Geräte und Chemikalien

In den zuvor beschriebenen Abschnitten wurden einige Geräte und deren Hersteller angegeben. Weiterhin wurden folgende Geräte verwendet:

Elektroporator	BioRad <i>Gene Pulser</i> , Pulse Controller (BioRad, München)
Inkubationsschüttler	TS1 Thermoshaker (Biometra, Göttingen)
Laborwippen	Rocking Platform (Biometra, Göttingen)
Laminarbox	LF MRF 06.12 GS (Steag, Pfullingen)
Magnetrührer	Magnetmix 2070 (Roth, Karlsruhe)
pH-Meter	MV870, Präcitronic (Dresden) 761 Calimetric Fa. Knick
Photometer	Spekol 1200 (Carl Zeiss Technology, Jena)
Spannungsgeber	Power Supply EV243 (Peqlab, Erlangen)
Thermoblock	Trio-Thermoblock , Nr. 9511386 (Biometra, Göttingen)
Waagen	Kern 572 (Kern & Sohn, Balingen-Frommern) EK-1200 (A&D, Japan) Feinwaage FX-200 (A&D, Japan)
Zentrifugen	Sorvall RC6 Plus (SLA-3000, SS34, Dupont Instruments, USA) Hettich Universal 30 RF (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen) Eppendorf Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg) Sorvall Discovery M120 SE (Kendro, Osterode) L8-60M Ultrazentrifuge (Beckmann, München)

Chemikalien (wenn nicht anders angegeben) wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Bioscience Europe	(Freiburg)
Fluka	(Buchs, CH)
Gerbu	(Gaiberg)
Invitrogen	(Karlsruhe)
Merck	(Darmstadt)
Sigma-Aldrich	(Steinheim)
Roche Diagnostics	(Mannheim)
Roth	(Karlsruhe)
SERVA	(Heidelberg)

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung und Reinigung von FocA und dessen Varianten

Schon 1994 konnte von Suppmann & Sawers gezeigt werden, dass das FocA Protein bei der Translokation von Formiat über die Cytoplasmamembran eine zentrale Rolle einnimmt. Dies wurde durch die Aufklärung der Kristallstruktur von FocA bestätigt und verschiedene Modelle für die Translokation wurden erstellt (Lü *et al.*, 2011; Waight *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009). Jedoch konnte bisher noch kein eindeutiger Mechanismus für die Translokation von Formiat gezeigt werden. Deshalb wurden anhand eines Aminosäure (AS) Vergleiches verschiedener FocA-Proteine bzw. verschiedener Vertreter der Formiat-Nitrit-Transporter (FNT)-Familie hochkonservierte und konservierte AS identifiziert, welche eventuell eine entscheidende Rolle in der Translokation von Formiat spielen könnten (siehe Anhang Abb. 37 + 38).

Ausgewählt wurden folgende AS (siehe Tabelle 9):

Tabelle 9 FocA Varianten und Eigenschaften der ausgetauschten AS

Konservierung in verschiedenen Organismen	Lokalisierung im FocA Protein	AS	Austausch zu AS	Polarität Acidität/Basizität
identische AS				
	transmembrane Region	Leucin 79	Alanin	polar → unpolar neutral → neutral
	Ω - Schleife	Phenylalanin 90	Tyrosin	unpolar → polar neutral → neutral
	Ω - Schleife	Asparagin 113	Serin	polar → polar neutral → neutral
	cytoplasmatische Schleife	Lysin 156	Glutamat	polar → polar basisch → sauer
	transmembrane Region	Valin 175	Alanin	unpolar → unpolar neutral → neutral
	transmembrane Region	Tryptophan 180	Phenylalanin	unpolar → unpolar neutral → neutral
	transmembrane Region	Lysin 191	Alanin	polar → unpolar basisch → neutral
	transmembrane Region	Phenylalanin 202	Alanin	unpolar → unpolar neutral → neutral
	S - Schleife	Glutamat 208	Alanin	polar → unpolar sauer → neutral

S - Schleife	Histidin 209	Tyrosin	polar → polar basisch → neutral
S - Schleife	Asparagin 213	Aspartat	polar → polar neutral → sauer
semi-konservierte AS			
*			
transmembrane Region	Aspartat 190	Alanin bzw. Lysin	polar → polar sauer → neutral bzw. polar → polar sauer → basisch
nicht konservierte AS			
N- Terminus	Lysin 26	Alanin	polar → unpolar basisch → neutral
transmembrane Region	Cystein 74	Serin	polar → polar neutral → neutral
transmembrane Region	Cystein 82	Serin	polar → polar neutral → neutral
Ω - Schleife	Leucin 89	Alanin	unpolar → unpolar neutral → neutral
transmembrane Region	Cystein 176	Serin	polar → polar neutral → neutral

*: als semikonserviert werden AS bezeichnet, die nicht identisch sind, allerdings derselben Gruppe zugeordnet werden können

Zur näheren Charakterisierung des FocA Proteins und dessen Varianten wurden diese zunächst überproduziert und gereinigt. Dies erfolgte mittels des *Strep-tag* basierten Expressions- und Reinigungssystems. Plasmide, welche für eine FocA Variante mit N- bzw. C-terminalen *Strep-tag* (FocA5 bzw. FocA3) codieren, wurden von Dörte Falke (Falke, 2010) hergestellt.

Da die FocA Variante mit N-terminalem *Strep-tag* in größeren Mengen überproduziert werden konnte, wurde das pASK-IBA5focA Plasmid als Ausgangs-Plasmid für eine gerichtete Mutagenese gewählt. Mittels spezifischer Primer wurden so einzelne Basenaustausche in das pASK-IBA5focA Plasmid eingeführt, die zu einem einzelnen AS Austausch führten. Die Varianten FocA (L89A) und FocA (F90Y) wurden im Weiteren von Doreen Hunger in ihrer Diplomarbeit näher charakterisiert (Hunger, Diplomarbeit 2012). Die Reinigung der einzelnen Proteine erfolgte mittels der *Strep-tag* basierten Affinitätschromatografie. Alle Varianten konnten mittels DDM aus der Membran gelöst und aus dieser gereinigt werden (Abb. 7).

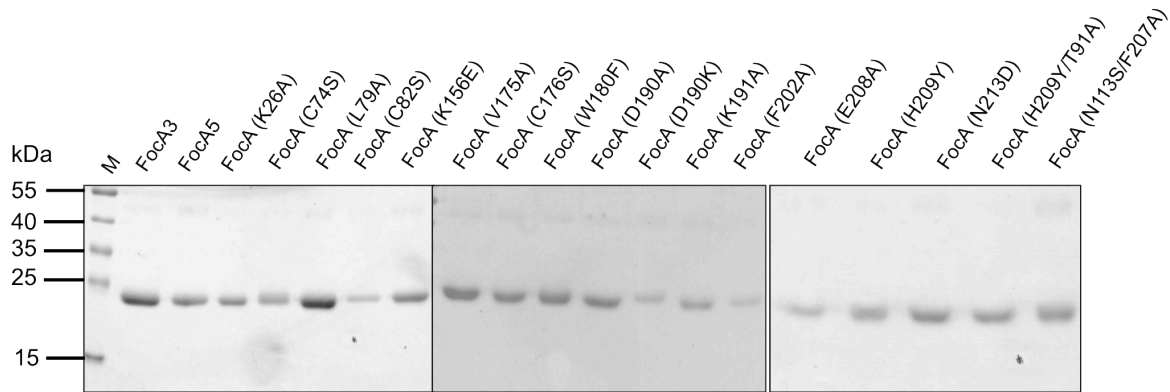


Abb. 7 Coomassie gefärbtes 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel. Analyse der gereinigten FocA-Varianten nach Affinitätschromatografie.

M: PageRuler Prestained (3 µl); jeweils 5 µg Protein aufgetragen

Aus je 3 Liter Anzucht konnte im Durchschnitt 1 mg Protein gereinigt werden. Die einzelnen Banden sind bei einer Größe von ca. 25 kDa sichtbar. Die berechnete Molekularmasse von FocA beträgt 31,5 kDa. Dieses aberrante Laufverhalten in der SDS-Page wurde schon 1994 von Suppmann & Sawers gezeigt und ist auf den hydrophoben Charakter des FocA Proteins zurückzuführen. Zwischen den einzelnen Varianten sind nur geringe Unterschiede im Laufverhalten zu sehen. Zudem ist bei allen Varianten eine zusätzliche Bande bei ca. 45 kDa sichtbar, welche jedoch eine bedeutend schwächere Intensität aufweist. Diese stellt wahrscheinlich das Dimer des FocA Proteins da.

Um die Synthese der einzelnen FocA-Varianten spezifisch nachzuweisen, wurden Western-Blot Analysen mit 2 verschiedenen Antikörpern (AK) und einem Konjugat durchgeführt. Als primäre AK dienten der AK FocA CD, wobei es sich um einen polyklonalen AK handelt der gegen das Gesamt-Protein gerichtet ist, und der AK FocA 8075, ein polyklonaler AK der 18 AS der periplasmatischen Schleife erkennt (siehe Abbildung 3). Zum Nachweis des N-Terminus diente das *Strep*-Tactin HRP Konjugat, da es den N-terminalen *Strep*-tag des Proteins erkennt. In Abb. 8 sind die Autoradiogramme der Western-Blot Analysen zu sehen.

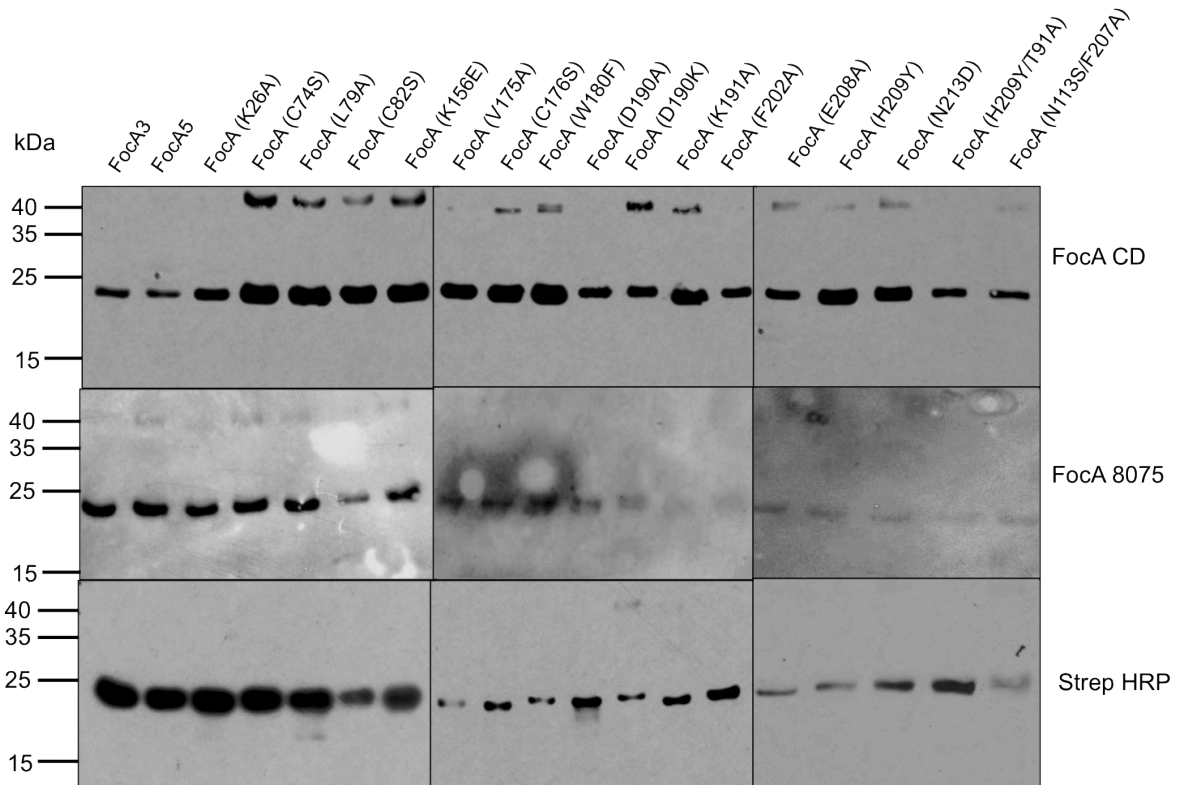


Abb. 8 Autoradiogramm nach Western-Blot Analyse eines 12,5%igen SDS Gels nach Reinigung der verschiedenen FocA Varianten;

Aufreinigung der Varianten durch Affinitätschromatografie nach aerober Anzucht der *E. coli* Expressionskultur BL21 + *pfocA*_{Mutante}. Es wurde je 1,5 µg Protein aufgetragen, AK FocA CD (1:3000), AK FocA 8075 (1:300), *Strep* HRP Konjugat (1:300).

Unter Verwendung des AK FocA CD konnte jeweils das Monomer des FocA Proteins nachgewiesen werden. Jedoch konnte nicht bei allen Varianten die Bande bei 45 kDa detektiert werden. Nicht nachweisbar war das Dimer bei beiden Wildtyp Varianten (FocA3 und FocA5), FocA (D190K), FocA (F202A) sowie FocA (H209Y/T91A). Western-Blot Analysen mit dem AK FocA 8075 zeigten bei allen Varianten eine Bande bei 25 kDa, doch nur bei wenigen Varianten eine schwache Bande bei 45 kDa (FocA3, FocA5, FocA (K26A), FocA (C74S), FocA (L79A), FocA (C82S), FocA (K156E) und FocA (C176S)). Der N-terminale *Strep*-tag konnte in allen Varianten des Monomers nachgewiesen werden. Das Dimer konnte nur bei den Varianten FocA (D190K) und FocA (K191A) detektiert werden.

3.2 Bestimmung der Sekundärstruktur der FocA-Varianten

Zur Ermittlung eventueller Unterschiede in der Sekundärstruktur der verschiedenen FocA-Varianten, welche auf AS-Austausche zurückzuführen wären, wurden Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen (Abb. 9). Diese Methode wird vorrangig für die Analyse der Anteile an β -Faltblättern und α -Helices in Proteinen genutzt. Schon 2010 konnte von Falke *et al.* die Sekundärstruktur des FocA Proteins aufgeklärt werden. Diese wies einen hohen Anteil an α -Helices (52-56 %) auf. Für die Untersuchung der Sekundärstruktur wurden die Proteine mit einer PD10-Säule in CD Puffer umgepuffert, da die Reinheit der verwendeten Pufferbestandteile wichtig für die Messung ist. Für die Messung wurden auch die unveränderten FocA-Varianten FocA3 und FocA5 hinzugezogen.

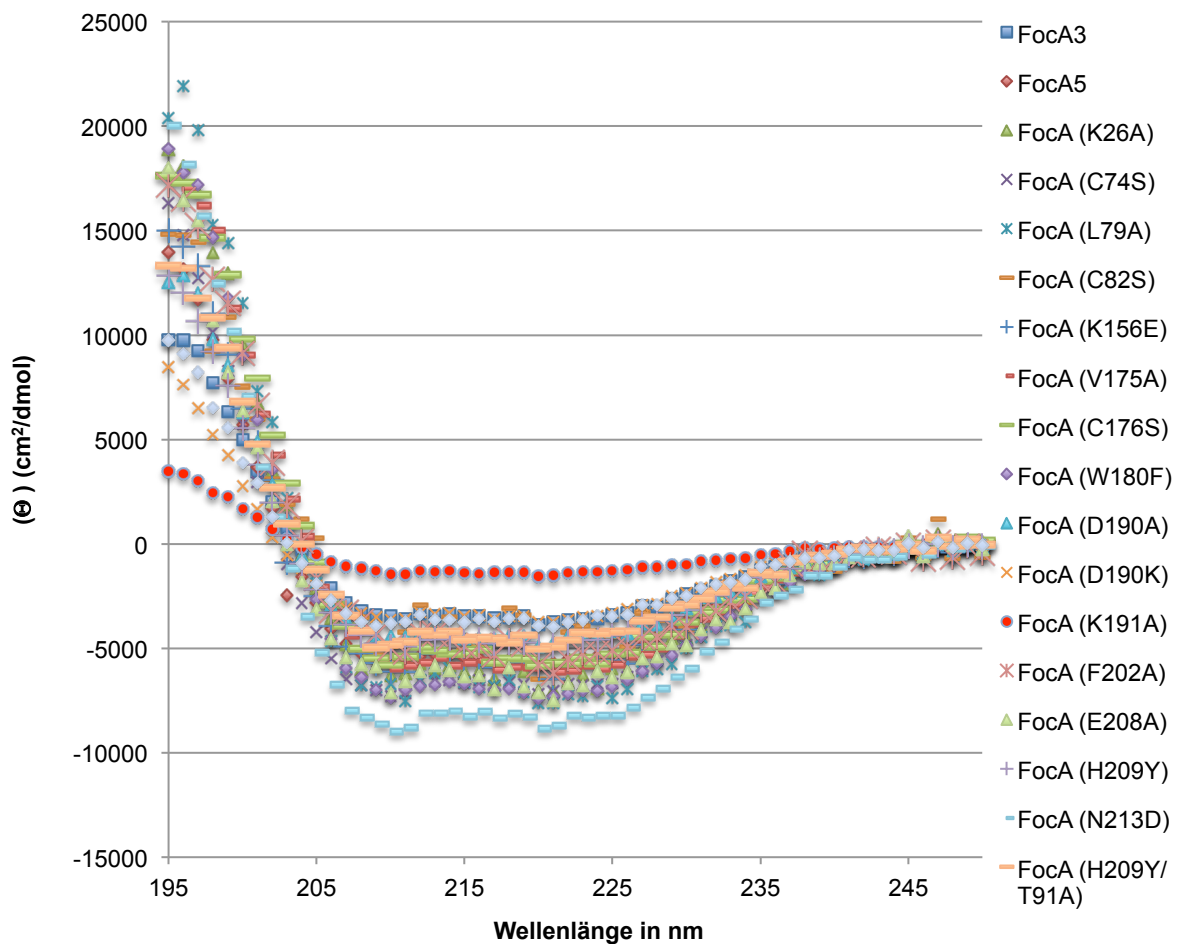


Abb. 9 Fern-UV-CD Spektren der verschiedenen FocA Varianten; durchgeführt bei 20 °C; eingesetzte Proteinkonzentrationen: 0,5-0,8 µg/µl

Alle Varianten zeigten wie das unveränderte FocA-Protein, einen hohen Anteil an α -Helices und wiesen keine wesentlichen Unterschiede zueinander auf. Lediglich das Spektrum der Variante FocA (K191A) zeigte bei gleichem Verlauf eine schwächere Intensität. Jedoch

wies auch dieses Spektrum die charakteristischen Minima bei 208 und 220 nm sowie ein Maximum unterhalb von 196 nm auf. Somit konnte mit dieser Messung gezeigt werden, dass der Austausch einzelner AS keine Auswirkung auf die Sekundärstruktur der FocA-Varianten hat.

3.3 Bestimmung der Quartärstruktur von FocA3, FocA5 und den FocA Varianten

Nachdem bei der Untersuchung der Sekundärstruktur keine Unterschiede zwischen den einzelnen FocA Varianten festgestellt werden konnten, wurde nun die Quartärstruktur ermittelt. Dazu wurde die Methode der *Blue-Native* (BN)-Page genutzt, welche es ermöglicht die Größe von nativen, nicht-denaturierten Proteinen zu bestimmen. Durch die Zugabe von Coomassie erhielten alle Proteine dieselbe Ladung und migrierten nun im Gel abhängig von ihrer Molekularmasse. Für das nicht veränderte FocA-Protein, FocA5, konnte eine charakteristische Bande bei ca. 160 kDa gezeigt werden (Abb. 10A). Diese Bande entspricht der Größe eines FocA-Pentamers, da ein Monomer eine berechnete Molekularmasse von 31,5 kDa aufweist. Das Pentamer konnte in einer Western-Blot Analyse mit dem AK Anti-FocA_{CD} ebenfalls spezifisch nachgewiesen werden (Abb. 10B).

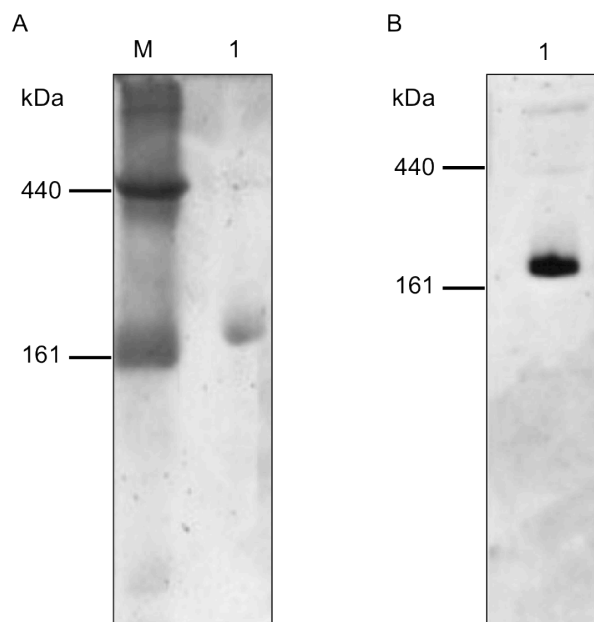


Abb. 10 BN-Page (5-13,5 %) und Autoradiogramm von FocA5

A: BN-Page; M: BN-Marker (7 μ l); 1: FocA5 (1,5 μ g)

B: Autoradiogramm nach Western-Blot Analyse einer BN-Page; 1: FocA5 (1 μ g); Anti-FocA_{CD} (1:3000)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei FocA wahrscheinlich um ein Pentamer handelt wurde nun untersucht, ob der Austausch einzelner AS einen Einfluss auf die Quartärstruktur der FocA Varianten hat. Dazu wurden die gereinigten Proteine auf ein 5-13,5%iges BN-Gel aufgetragen (Abb. 11). Zur Kontrolle wurden sowohl FocA5 als auch

FocA3 herangezogen. Einige Varianten (FocA (K26A), FocA (C74S), FocA (L79A), FocA (K156E), FocA (V175A), FocA (C176S), FocA (K191A), FocA (F202A), FocA (H209Y/T91A)) migrierten ähnlich wie das unveränderte FocA5 bei 160 kDa. Jedoch zeigten andere Varianten starke Unterschiede in der Quartärstruktur. Die Varianten FocA (C82S), FocA (W180F), FocA (D190K), FocA (E208A), FocA (H209Y), FocA (N213D), FocA (H209Y/T91A) und FocA (N113S/F207A) zeigten 3 bis 4 Proteinbanden unterhalb von 160 kDa (siehe auch Abbildung 12). Die stärkste Bande wies eine Größe auf, die dem Dimer entsprechen könnte. Die Variante FocA (D190A) zeigte eine starke Bande bei ca. 440 kDa, welche auf ein mögliches Pentadekan (Trimer aus Pentameren) schließen lässt. Auffällig war jedoch auch, dass es eine leichte Veränderung im Laufverhalten des Pentamers gab und nicht alle pentameren Formen auf genau der gleichen Höhe migrierten.

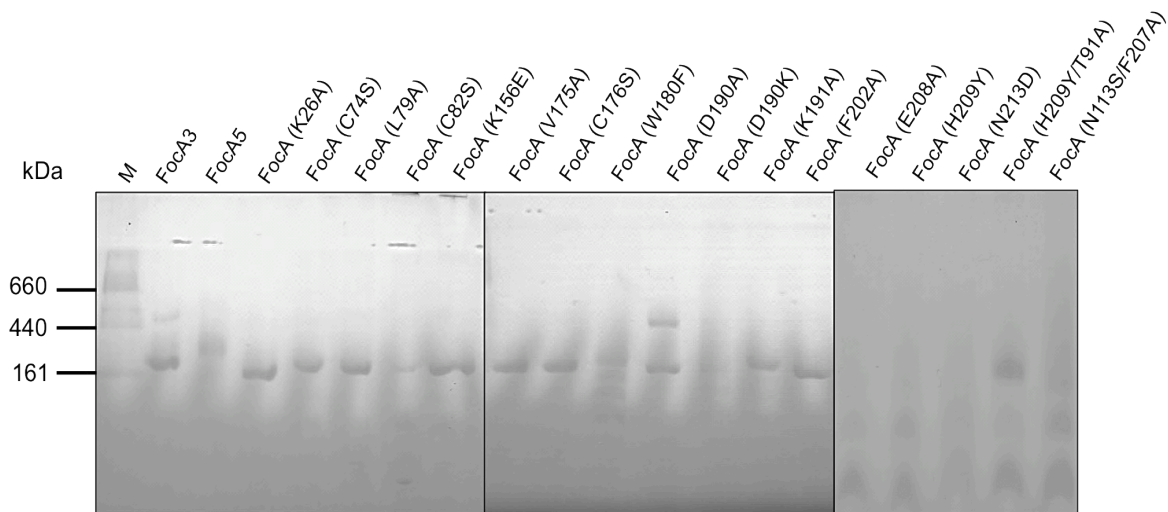


Abb. 11 BN-Page (5-13,5 %) zur Analyse der nativen Struktur verschiedenen FocA-Varianten
 M: BN-Marker (7 µl); jeweils 1,5 µg Protein aufgetragen.

Nachdem alle Protein Varianten in der BN-Page nachgewiesen werden konnten, wurden diese nun spezifisch mittels Western-Blot Verfahren untersucht. Dazu wurden alle Varianten auf eine BN-Page geladen und diese nach der Übertragung auf die Nitrocellulosemembran mittels der 3 verschiedenen AK bzw. Konjugate detektiert (Abb. 12).

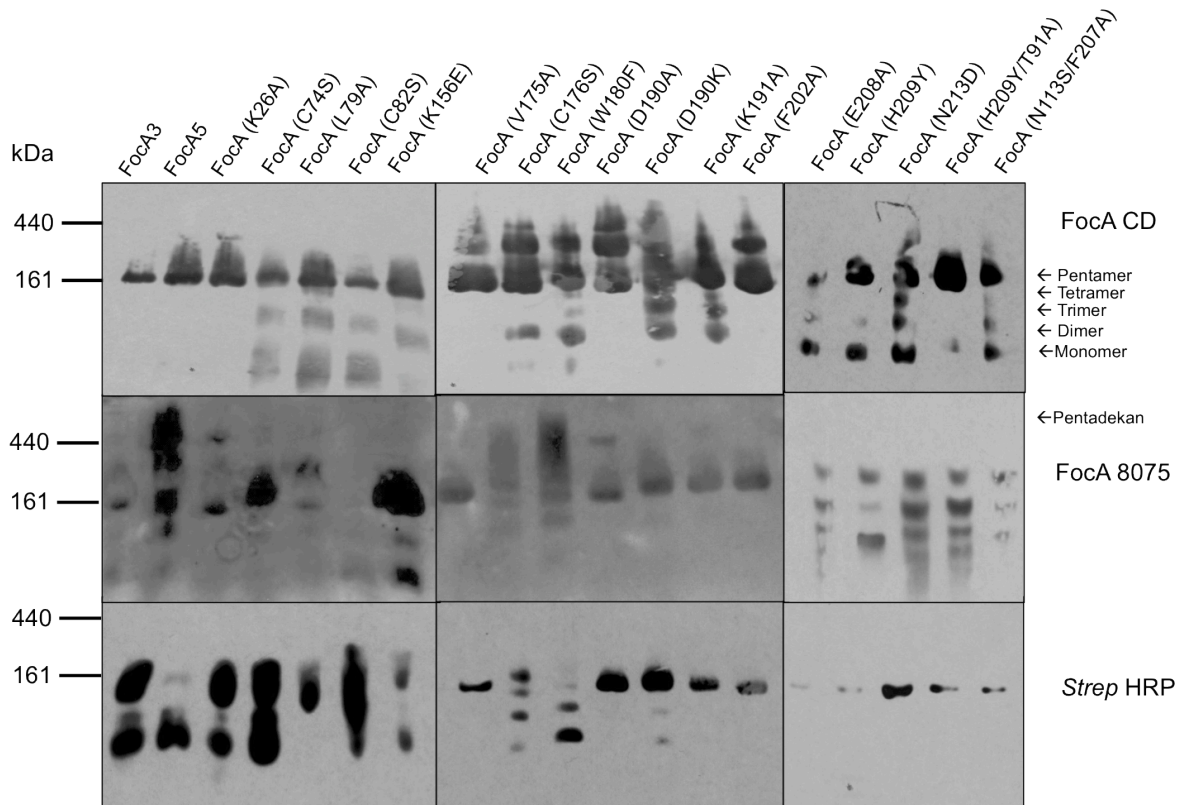


Abb. 12 Autoradiogramm nach Western-Blot Analyse einer BN-Page (5-13,5 %) der nativen Form der FocA Varianten

Die Molekularmassen sind links im Bild zu sehen; jeweils 1,5 µg Protein aufgetragen; verwendete AK: FocA CD AK 1:3000; FocA 8075 AK (1:300); *Strep*-Tactin HRP Konjugat (1:100000).

Unter Verwendung des AK FocA CD konnte bei allen Varianten die pentamere Form des FocA Proteins nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich bei den Varianten FocA (K26A), FocA (V175A), FocA (C176S), FocA (W180F), FocA (D190A), FocA (D190K), FocA (K191A) sowie FocA (F202A) eine Bande zwischen 160 kDa und 440 kDa. Im Fall von FocA (D190K) wurde zusätzlich eine Bande bei ca. 440 kDa, die dem Pentadekan entsprechen würde, beobachtet. Ebenfalls konnten weitere Banden unterhalb der 160 kDa Bande detektiert werden, die dem Monomer, Dimer, Trimer bzw. Tetramer entsprechen (FocA (C74S), FocA (L79A), FocA (C82S), FocA (K156E), FocA (C176S), FocA (W180F), FocA (D190K), FocA (K191A), FocA (E208A), FocA (H209Y), FocA (N213D), FocA (H209Y/T91A), FocA (N113S/F207A)).

Unter Nutzung des AK der gegen 18 AS einer periplasmatischen Schleife gerichtet ist (FocA 8075; Abbildung 12B) konnten fast alle Pentamere (außer FocA (C82S)) nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten alle Formen nachgewiesen werden, welche auch in der BN-Page (Abb. 11) am stärksten sichtbar waren.

Bei Western-Blot Analysen mittels des *Strep*-Tactin-HRP Konjugates (*Strep* HRP) wurden alle Pentamere nachgewiesen, jedoch bei den Varianten FocA5, FocA (W180F), FocA (E208A) und FocA (H209Y) waren die detektierten Banden sehr schwach (Abbildung 12C). Die kleineren Banden bei FocA3, FocA5, FocA (K26A), FocA (C74S), FocA (C82S), FocA

(K156E), FocA (C176S) und FocA (W180F) wurden auch detektiert. Bei den Varianten FocA (V175A), FocA (K191A), FocA (E208A), FocA (H209Y), FocA (N213D), FocA (H209Y/T91A) und FocA (N113S/F207A) konnte nur das Pentamer nachgewiesen werden, obwohl Banden unterhalb von 440 kDa auch in der BN-Page (siehe Abbildung 11) gezeigt werden konnten. Bei keiner Variante konnte ein Pentadekan detektiert werden.

3.4 Physiologische Charakterisierung der FocA Varianten

Die unter 3.1 hergestellten FocA Plasmide, welche für jeweils eine FocA Variante kodieren, wurden zur näheren Charakterisierung in die Stämme DH201 und DH701 transformiert (2.6.2). Mit Hilfe der transformierten Plasmide wurde gezeigt, ob die verschiedenen FocA-Varianten synthetisiert werden und die Fähigkeit besitzen Formiat über die Membran zu translozieren. Diese Fähigkeit soll nachfolgend als Formiattranslokation bezeichnet werden und gibt eine indirekte Aussage über die interne Formiatmenge in *E. coli*, welche mittels des Formiat-abhängigen *fdhF_P::lacZ* Fusionskonstruktes bestimmt werden kann (Rossmann *et al.* 1991).

3.4.1 *In vivo* Untersuchungen zur Formiattranslokation im Stamm DH201

Nachdem schon 1994 von Suppmann & Sawers gezeigt werden konnte, dass FocA an der Formiattranslokation beteiligt ist, wurde nun näher untersucht, ob einzelne AS-Austausche Effekte auf die Translokation ausüben. Mit Hilfe einer indirekten Bestimmung des internen Formiatspiegels sollten Vergleiche zwischen den nicht veränderten FocA Varianten und den Varianten mit AS-Austauschen getroffen werden. Hierzu wurde ein *fdhF_P::lacZ*-Fusionskonstrukt verwendet, welches chromosomal in die *E. coli* Stämme integriert wurde (Beyer, Diplomarbeit 2009). Der Promotor des *lacZ*-Fusionskonstruktes wird unter Formiatbindung in der Zelle durch den Transkriptionsaktivator FhIA induziert und das Enzym β -Galaktosidase wird synthetisiert. Der Stamm DH201 besitzt eine Deletion in den Genen *focA* und *pfIB*, d.h. er besitzt kein funktionelles FocA-Protein in der Membran und ist zudem aufgrund der fehlenden Pyruvat-Formiat-Lyase nicht in der Lage intern Formiat zu bilden. Deshalb wurden in diesen Stamm Plasmide, welche für die verschiedenen FocA-Varianten codieren, transformiert um eventuelle Effekte des AS-Austausches zu zeigen. Für die Messung wurden alle Stämme anaerob in TYEP-Medium (pH 6,85) bei 37 °C angezogen. Es konnte gezeigt werden, dass alle FocA-Varianten in die Membran des Stammes DH201 integriert wurden (Abb. 13). Als Kontrolle wurde ein Stamm verwendet der nur den Leervektor (IBA5) enthielt, also kein FocA in die Membran integriert hat.

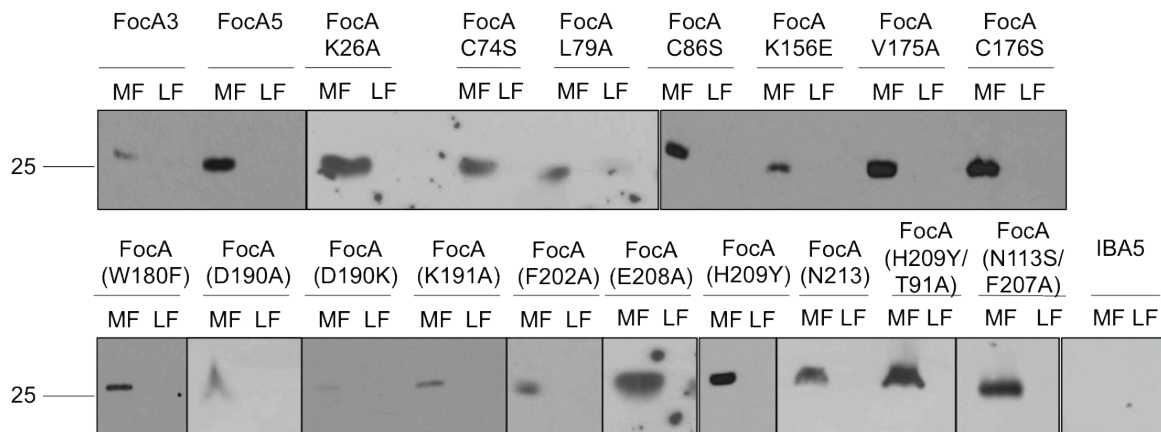


Abb. 13 Autoradiogramm der Membranfraktionen (MF) und löslichen Fraktionen (LF) von DH201

Western-Blot Analyse einer 12,5%igen SDS-Page, FocA CD AK (1:3000), je 50 µg Protein aufgetragen.

Wie in Abb. 13 zu sehen ist, konnte in jedem Stamm das FocA Protein nachgewiesen werden. Nur FocA (D190K) zeigte verhältnismäßig wenig FocA in der Membran.

Die dazu gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Abb. 14 dargestellt. Der Übersicht halber wurden unter die einzelnen Balken nur die einzelnen Positionen der AS-Austausche aufgezeigt, bzw. wurden die nicht veränderten Varianten mit FocA3 (FocA mit C-terminalen *Strep-tag*) und FocA5 (FocA mit N-terminalen *Strep-tag*) bezeichnet. Alle Aktivitätsmessungen wurden mindestens 18-fach bestimmt.

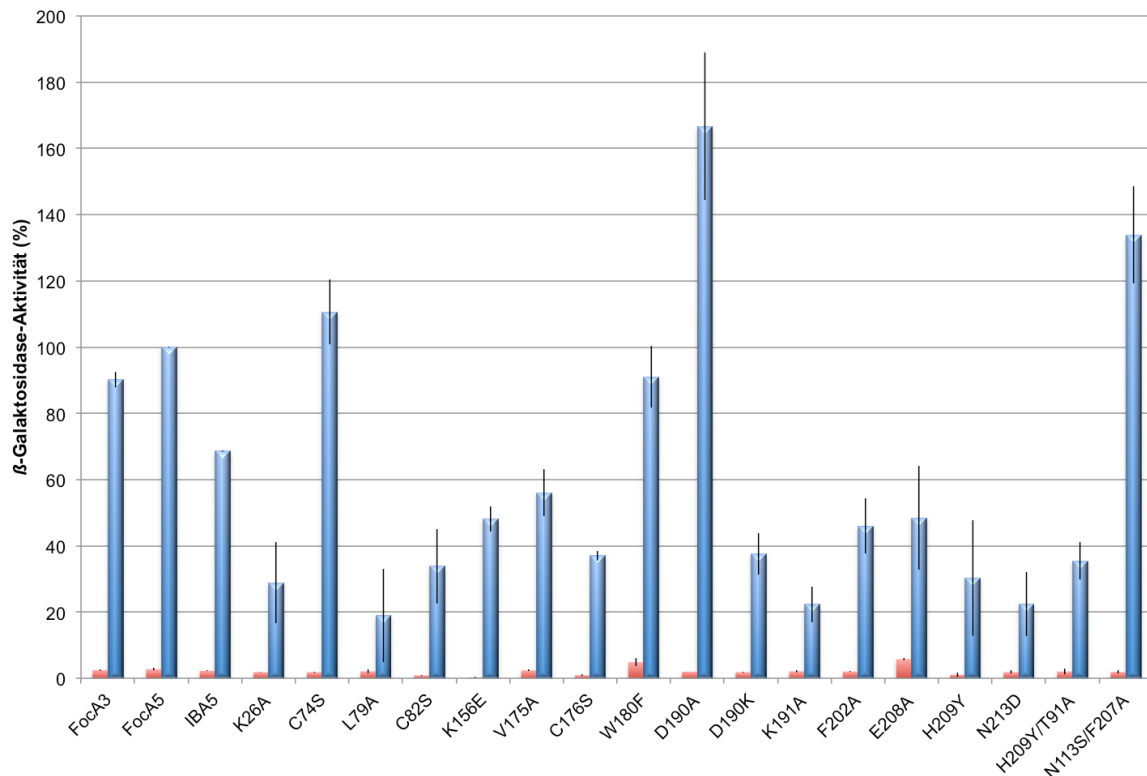


Abb. 14 Darstellung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität nach anaerober Anzucht des *E. coli* Stammes DH201

DH201 mit transformierten Plasmiden anaerob angezogen bei 37 °C in TGYEP-Medium; pH 6,85; mit 0 mM Formiat (■) bzw. 20 mM Formiat (■) im Medium; n= 18

Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsreihen wurde die Aktivität des Stammes DH201 mit dem Plasmid FocA5 bei Zugabe von 20 mM Formiat auf 100 % (entspricht ca. 1725 Miller Units (MU)) gesetzt und alle anderen Aktivitäten zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt. Als Kontrolle wurde ein Stamm verwendet der nur den Leervektor (IBA5) enthielt, also kein FocA in die Membran integriert hat. Alle Stämme wurden sowohl ohne als auch mit (20 mM) Formiat im Medium kultiviert. Wie aus Abb. 14 zu erkennen ist, konnte ohne die Zugabe von Formiat zum Medium nur eine sehr geringe Aktivität von ca. 2-5 % detektiert werden. Unter Zugabe von Formiat konnte bei dem Stamm mit Leervektor (IBA5) eine Aktivität von ca. 70 % bestimmt werden. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass neben FocA noch ein weiteres Translokationssystem in *E. coli* existiert und bestätigt frühere Vermutungen (Beyer, 2009; Suppmann & Sawers, 1994). Die FocA-Wildtyp-Variante mit C-terminalen *Strep-tag* (FocA3) wies eine um 10 % geringere Aktivität als FocA5 auf. Ähnlich dem Wildtyp verhielten sich die Varianten mit Austauschen an den Positionen 74 und 180. Nur die Variante in der ein Aspartat an Position 190 zu einem Alanin ausgetauscht wurde, sowie die Doppelmutante N113S/F207A zeigten eine höhere Aktivität (ca. 170 % und ca. 135 %). Im Gegensatz dazu führte ein Austausch dieses Aspartats (D190) zu einem Lysin zu einer bedeutend geringere β -Galaktosidase-Aktivität auf, welche mit ca. 36 % selbst niedriger ist, als die β -Galaktosidase-Aktivität des Stammes

mit Leervektor. FocA (D190K) sowie die Varianten FocA (K26A), FocA (L79A), FocA (C82S), FocA (K156E), FocA (V175A), FocA (C176S), FocA (K191A), FocA (F202A), FocA (E208A), FocA (H209Y), FocA (N213D) und FocA (H209Y/T91A) zeigten eine niedrigere β -Galaktosidase-Aktivität als FocA5 und die Leervektor-Kontrolle (IBA5).

Es konnte gezeigt werden, dass bis auf die Varianten FocA (C74S) und FocA (W180F) alle Varianten einen Einfluss auf die Formiattranslokation haben.

3.4.2 *In vivo* Untersuchungen zur Formiattranslokation im Stamm DH701

Der Stamm DH701 ist durch die Insertion von zwei Stopp-Codons im *focA*-Gen nicht in der Lage ein funktionelles FocA-Protein chromosomal zu synthetisieren. Er kann dennoch ein funktionelles PflB Protein synthetisieren und somit intern Formiat bilden (Suppmann & Sawers, 1994). Da auch DH701 ein chromosomales *fdhF_P::lacZ*-Fusionsprodukt hat, kann mit Hilfe dieses Stammes eine Aussage über Änderungen des internen Formiatpiegels getroffen werden. Die Abb. 15 zeigt die Ergebnisse der Messungen.

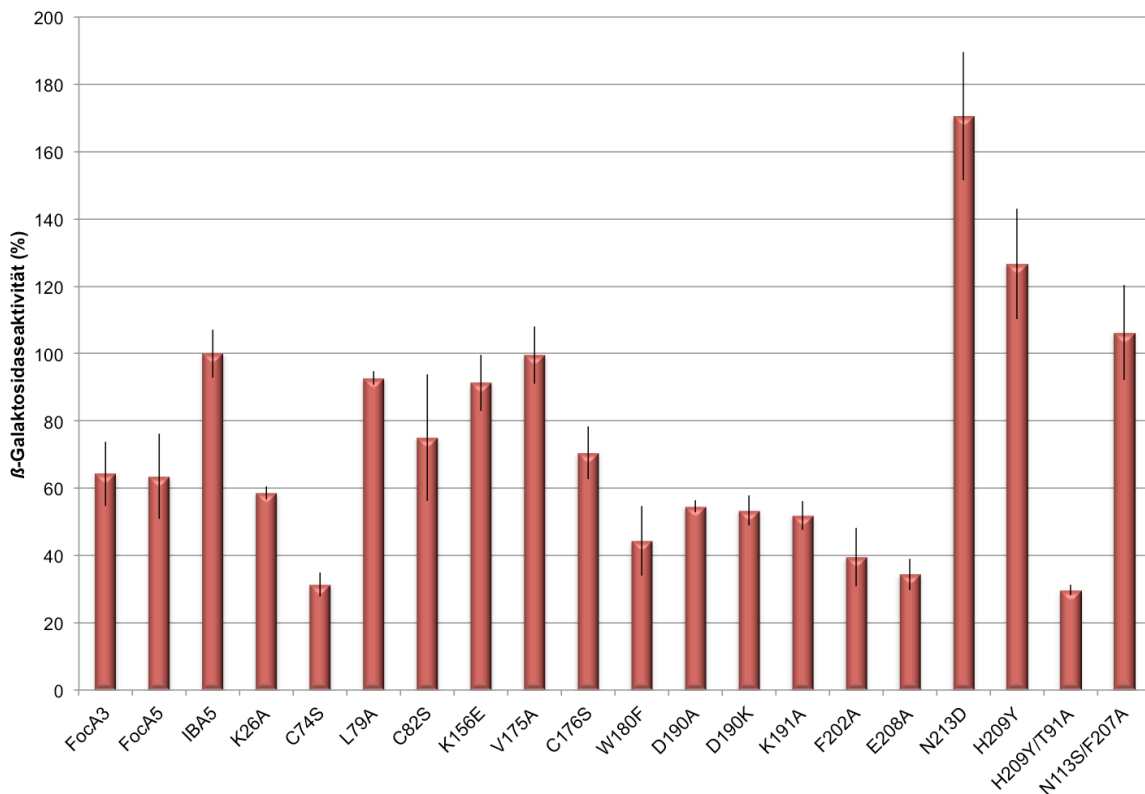


Abb. 15 Darstellung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität nach anaerober Anzucht des *E. coli* Stammes DH701

DH701 mit transformierten Plasmiden anaerob angezogen bei 37 °C in TGYEP-Medium, pH 6,85; ohne zusätzliches Formiat im Medium; n=18.

Alle Messungen wurden anaerob bei 37 °C in TGYEP- Medium (pH 6,85) durchgeführt. Es erfolgte keine Zugabe von Formiat, da mit diesem Versuch hauptsächlich der Export bzw. Re-Import von intern produziertem Formiat betrachtet werden sollte. In dieser Abb. wurde

die Aktivität des Stammes mit transformiertem Leervektor (IBA5) gleich 100 % (entspricht ca. 1250 MU) gesetzt, da dieser Stamm durch das Fehlen eines funktionellen FocA-Proteins kein intern produziertes Formiat FocA-abhängig translozieren kann. Die Varianten FocA3, FocA K26A, FocA C82S, FocA C176S, FocA W180F, FocA D190A, FocA D190K, FocA K191A und FocA F202A verhielten sich wie die Wildtyp-Variante FocA5 (ca. 63 %), d.h. es gab keine Unterschiede in der Translokation von Formiat. Auffällig war auch, dass mehrere Varianten (FocA L79A, FocA K156E, FocA V175A und FocA N113S/F207A) sich ähnlich der Leervektor-Kontrolle verhielten, was schlussfolgern ließe, dass diese Varianten Formiat nicht mehr FocA-abhängig ins Periplasma translozieren können. Unter Einbeziehung der Ergebnisse der Messung mit den DH201 Stämmen, lassen sich folgende Schlussfolgerungen treffen: FocA L79A, FocA C82S, FocA K156E und FocA V175A und FocA H209Y (niedrige β -Galaktosidase-Aktivität) sind wahrscheinlich im Import und im Export gestört. Die Variante FocA N113S/F207A, welche in der Messung des Stammes DH201 eine stark gesteigerte Aktivität aufwies, ist wahrscheinlich für die Regulation des Importes verantwortlich und nicht in der Lage Formiat zu exportieren. Die Variante FocA N213D zeigte eine β -Galaktosidase-Aktivität von ca. 170 % und liegt somit höher als der Stamm mit Leervektor. Die FocA D190A Variante zeigte eine verbesserte Aufnahme von Formiat in DH201.

3.5 Überproduktion der cytosolischen Proteine PflB, PflD, PflF und TdcE

Neben dem Membranprotein FocA und dessen Varianten wurden verschiedene andere Vertreter der Glycyl-Radikal-Enzyme (GRE)-Familie für Interaktionsstudien überproduziert und gereinigt. Eine Übersicht über einige Eigenschaften der Proteine ist in Tabelle 10 zu sehen.

Tabelle 10 Übersicht der Proteineigenschaften

Protein	Gengröße (bp)	berechnete Molekularmasse (kDa)	Funktion
PflB	2283	85,4	Pyruvat-Formiat-Lyase
PflD	2298	86,0	vorhergesagte Funktion als Glycyl-Radikal Enzym; unbekanntes Substratspektrums
PflF	2433	90,0	vorhergesagte Funktion als Glycyl-Radikal Enzym; unbekanntes Substratspektrums
TdcE	2295	86,0	2-Ketobutyrat-Formiat-Lyase, Pyruvat-Formiat-Lyase

Zunächst wurden die Plasmide der ASKA-Kollektion (Kitagawa *et al.*, 2005), welche jeweils für die Proteine PflB, PflD und PflF codieren, in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert und

aerob kultiviert. Die Reinigung der Proteine PflB, PflD und PflF fand nach dem IMAC-Verfahren (2.7.4) statt. Nach der Überproduktion von TdcE wurde dessen Reinigung von Dörte Falke (Falke, Diplomarbeit 2010) mittels des Intein-CBD Systems durchgeführt. Das gereinigte Protein wurde freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Alle gereinigten Proteine sind in Abb. 16 dargestellt.

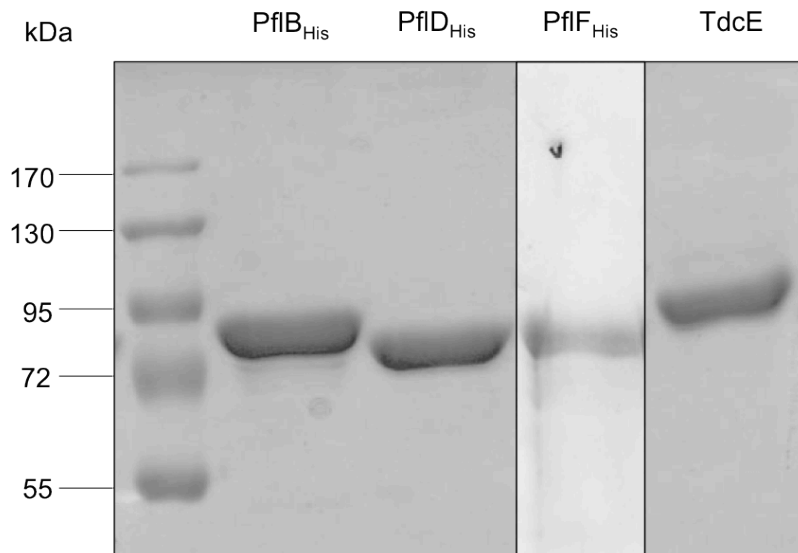


Abb. 16 Coomassie gefärbtes 10%iges (w/v) SDS-Polyacrylamidgel. Analyse der gereinigten Proteine

M: PageRuler Prestained (3 μ l); jeweils 5 μ g Protein aufgetragen

Wie in der Abb. zu erkennen ist, konnten alle Proteine bis zur Homogenität gereinigt werden. Die Banden in Abb. 16 entsprechen nicht zu 100 % den berechneten Molekularmassen (siehe Tabelle 10), daher ist auch bei diesen Proteinen ein aberrantes Laufverhalten nicht auszuschließen. Somit konnten alle Proteine für weitere *in vitro* Untersuchungen eingesetzt werden.

3.6 Untersuchungen zu möglichen Interaktionspartnern von FocA

Bis heute ist der Mechanismus der Formiattranslokation sowie deren Regulation noch nicht vollständig aufgeklärt. Als möglicher Regulationsmechanismus wäre eine pH-abhängige Konformationsänderung des FocA-Proteins denkbar (Lü *et al.*, 2011). Eine weitere Möglichkeit wäre die Regulation durch die Bindung eines Interaktionspartners von FocA. Schon 2010 konnte D. Falke in ihrer Diplomarbeit erste Hinweise darauf liefern, dass FocA mit dem Protein PflB interagiert. Diese Interaktion sollte mit den folgenden Versuchen bestätigt und näher charakterisiert werden.

3.6.1 FocA abhängige Lokalisation von PflB an der Cytoplasmamembran

Wie bereits erwähnt spielt das membranständige Protein FocA eine maßgebliche Rolle im Formiat-Stoffwechsel. Ein möglicher Interaktionspartner stellt das Glycylradikal-Enzym PflB

dar, welches Pyruvat zu Formiat und Acetyl-CoA spaltet. Da diese Enzym für einen großen Anteil des in der Zelle produzierten Formiats verantwortlich ist und die Gene *focA* und *pflB* in einem Operon organisiert vorliegen und cotranskribiert werden, wurde untersucht, ob es zu einer FocA abhängigen Colokalisation von PflB an der Cytoplasmamembran kommt.

Zur Untersuchung wurden die *E. coli* Stämme MC4100, RM201, REK702, REK701 und 234M1 herangezogen. Der Stamm MC4100 ist ein Wildtyp Stamm. Kennzeichnend für den Stamm RM201 ist die Deletion der Gene *focA* und *pflB*, weshalb weder FocA noch PflB synthetisiert werden. Im Stamm REK702 wurde das Start-Codon des *focA* Gens GTG zu ATG ausgetauscht, was dazu führt, dass im Vergleich zum Wildtyp MC4100 eine höhere Menge an FocA synthetisiert wird. Im Stamm REK701 sind durch Mutation zwei Stopp-Codons in das *focA* Gen eingeführt wurden, so dass kein funktionsfähiges FocA Protein gebildet werden kann. Durch eine Deletion des *pflA*-Gens kann kein funktionsfähiges PflB Protein im Stamm 234M1 gebildet werden. Teilweise wurden in die einzelnen Stämme Plasmide transformiert um eine Komplementation zu zeigen. Genutzt wurden die Plasmide pASK-IBA3focA, pASK-IBA5focA, p29 (*pflB*, *pflA*, *focA*) und p29/1 (*pflB*, *pflA*). Zur Untersuchung wurden die Zellen anaerob in LB-Medium angezogen und bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 0,8 kultiviert. Es erfolgte keine Zugabe von Induktoren zum Medium. Nach der Ernte wurden die Zellen aufgeschlossen und mittels Ultrazentrifugation in Membranfraktion (MF) und lösliche Fraktion (LF) geteilt. Um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen, wurde die MF zweimal mit Puffer W gewaschen. Anschließend wurden je 50 µg Protein auf ein 10%iges (w/v) SDS-Gel aufgetragen und mittels Western-Blot Analyse mit einem anti-PflB AK detektiert. Das Ergebnis ist in Abb. 17 zu sehen. Als Kontrolle wurden die Fraktionen auch auf das Vorhandensein von FocA mit dem AK FocA CD untersucht.

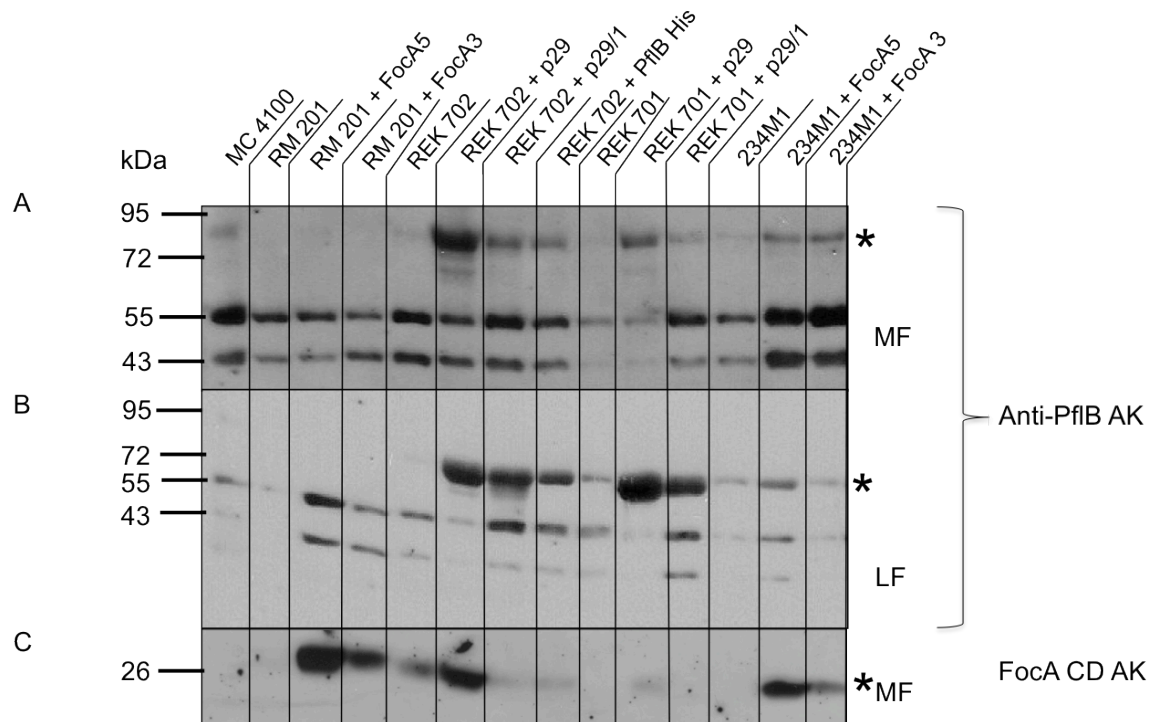


Abb. 17 Autoradiogramm nach Western-Blot Analyse der Membranfraktion und löslichen Fraktion verschiedener *E. coli* Stämme;

A: Detektion der Membranfraktion mit anti-PflB AK (1:3000); je 50 µg Protein aufgetragen
 B: Detektion der löslichen Fraktion mit anti-PflB AK (1:3000); je 50 µg Protein aufgetragen
 C: Detektion der Membranfraktion mit FocA CD AK (1:3000); je 50 µg Protein aufgetragen
 Die PflB bzw. FocA Polypeptide sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Die anderen kreuzreagierenden Polypeptide bei 55 und 43 kDa sind unbekannt.

In der MF und in der LF des Stammes MC4100 konnte eine leichte Bande bei ca. 85 kDa detektiert werden, welche der errechneten Molekularmasse von PflB entspricht, obwohl die Menge an FocA in der MF zu gering zu sein scheint um es im Western-Blot zu detektieren. Keine Bande bei 85 kDa konnte jedoch im *focA/pflB* Deletionsstamm-Stamm RM201 detektiert werden, auch wenn die Menge an FocA erhöht wurde (Abb. 17C). Wurde das Start-Codon von FocA ausgetauscht (REK702) konnte sowohl in der MF als auch in der LF eine PflB Bande detektiert werden. Steigerte man die Menge an FocA und PflB in der Zelle durch die Transformation des Plasmids p29, konnte eine starke Bande bei der entsprechenden Größe sowohl in der MF als auch in der LF nachgewiesen werden. Wurde hingegen nur die Menge an PflB erhöht (p29/1 oder PflB_{His}) zeigte sich nur eine schwache Bande bei 85 kDa. In der MF des Stammes REK701 konnte keine Bande detektiert werden. Wurde allerdings p29 in die Zellen transformiert war PflB in der MF schwach nachweisbar. Nach der Transformation von p29/1 war nur eine schwache Bande sichtbar. Der Stamm 234M1 zeichnet sich durch das Vorhandensein von inaktivem PflB aus, welches wie in Abb. 17 zu sehen ist, auch an der Membran FocA-abhängig colokalisiert ist. Bei allen Stämmen konnten die zu erwartenden Mengen an FocA nachgewiesen werden (Abb. 17 C).

3.6.2 *In vitro* Untersuchungen zur Interaktion zwischen FocA und PflB

3.6.2.1 *Pull-down Assay mit Protein A-coated magnetic beads*

Zur Bestimmung einer Interaktion zwischen zwei Proteinen direkt in einer Membranfraktion bietet sich das System des *pull-downs* mit Protein A-coated magnetic beads an. Dazu wurden verschiedene Stämme anaerob angezogen, aufgeschlossen und die Membranfraktion aufgereinigt. Anschließend wurden die MF mit *n*-Dodecyl- β -maltosid (DDM) solubilisiert und mit anti-PflB AK inkubiert. Nach Bindung des AK an die Protein A-coated magnetic beads wurden diese mehrfach gewaschen um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend auf eine 10%ige (w/v) bzw. 12,5%ige SDS-Page geladen (Abb. 18).

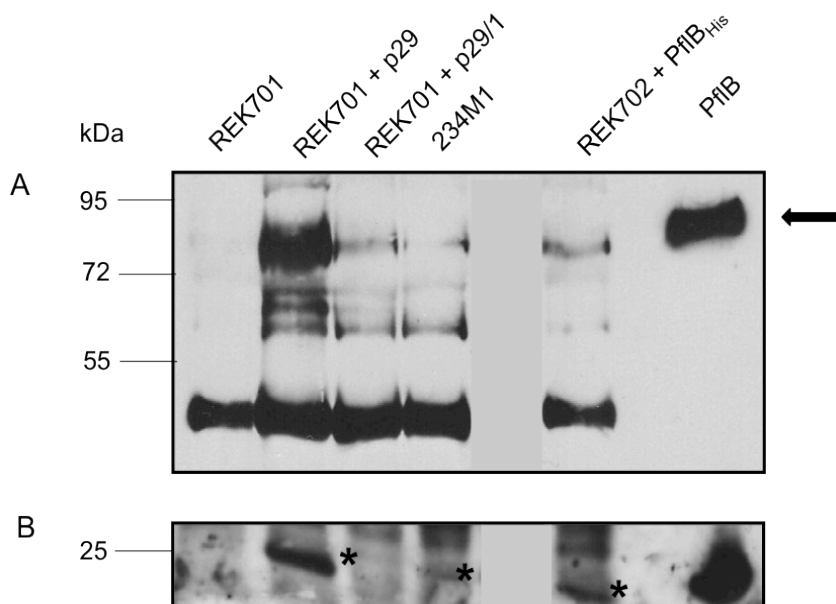


Abb. 18 Autoradiogramm nach Western-Blot Analyse des Protein A *pull-downs*

A: Elutionsfraktionen aufgetragen auf eine 10%ige SDS-Page, Detektion mit anti-PflB AK (1:3000);

B: Elutionsfraktionen aufgetragen auf eine 12,5%ige SDS-Page, Detektion mit AK FocA 8075 (1:300);

Pfeil: PflB Protein; ★ FocA; 25 μ l Elutionsfraktion aufgetragen

Als Kontrollen wurden sowohl das gereinigte PflB (A) sowie das gereinigte FocA Protein (B) aufgetragen. Unter Nutzung des Stammes REK701, welcher 2 Stopp-Codons im *focA* Gen besitzt, konnte kein PflB in der MF nachgewiesen werden. Wurde in diesen Stamm allerdings das Plasmid p29 transformiert, konnte PflB FocA-abhängig in der MF nachgewiesen werden. Wurde das Plasmid p29/1 verwendet, welches nur für *pflB* und *pflA* codiert, konnte nur eine schwache Bande bei ca. 85 kDa gezeigt werden, welche der Größe

von PflB entspricht. Die Elutionsfraktion des Stammes 234M1, ohne PflA zeigt, dass PflB auch in der inaktiven Form an der Membran lokalisiert ist, wenn FocA vorhanden ist. Auch im Stamm REK702 + PflB_{His} konnte eine Interaktion von getaggtten PflB mit der Membran nachgewiesen werden (Western-Blot Analyse mit anti His AK nicht gezeigt).

3.6.2.2 *Pull-down Assay mit Streptactin-coated magnetic beads*

Der *pull-down* Assay mit Streptactin-coated magnetic beads eignet sich zur Bestimmung einer Interaktion zwischen zwei gereinigten Proteinen. Hierfür sollte ein Interaktionspartner einen *Strep tag* tragen, der zweite Interaktionspartner kann durch andere *tags* markiert sein oder nativ vorliegen.

Interaktion von FocA5 mit verschiedenen löslichen Fraktionen und gereinigtem PflB_{His}

In dem hier gezeigten Experiment (Abb. 19) wurde zunächst das N-terminal *Strep*-getaggte FocA-Protein an die *magnetic beads* gebunden. Nach mehrmaligem Waschen wurden verschiedene lösliche Fraktionen zu den *beads* gegeben und erneut inkubiert. Die eluierten Fraktionen wurden auf eine 12,5%ige SDS-Page geladen und mittel anti-PflB AK detektiert.

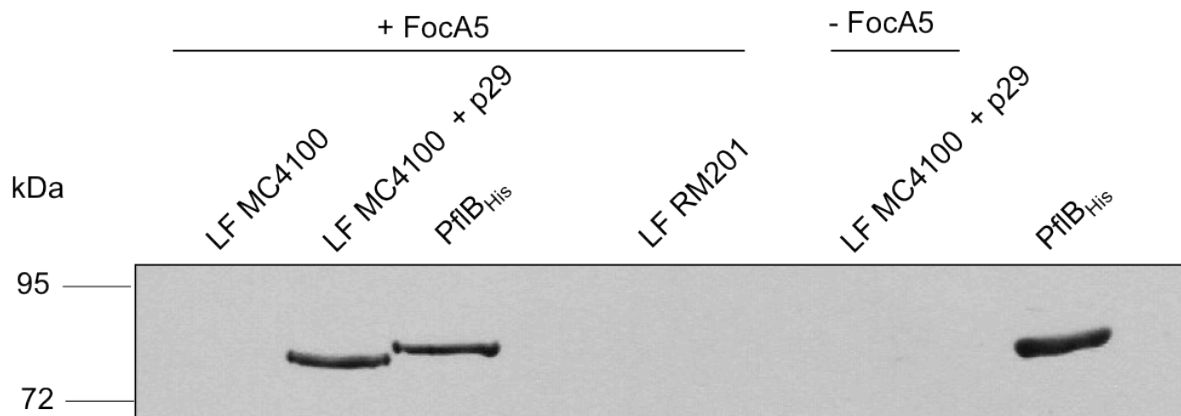


Abb. 19 Autoradiogramm nach *pull-down* Analyse mittels Streptactin-coated magnetic beads Western-Blot Analyse nach 10%iger (w/v) SDS-Page; anti-PflB AK (1:3000); 25 µl Elutionsfraktion und 2 µg gereinigtes PflB wurden aufgetragen.

Unter Verwendung einer LF des Stammes MC4100 und dem FocA5 Protein konnte kein Signal im Western-Blot detektiert werden. Wurde in diesen Stamm allerdings das Plasmid p29 transformiert zeigte sich eine deutliche Band bei ca. 85 kDa, die der berechneten Molekularmasse von PflB entspricht (die letzte Spur zeigt gereinigtes PflB). Eine Bande, welche über der 85 kDa Bande lief, konnte unter Verwendung des FocA5-Proteins und dem His getaggtten PflB-Protein nachgewiesen werden. Wurde eine LF eines $\Delta focA \Delta pflB$

Stammes verwendet konnte kein Signal detektiert werden. Als weitere Kontrolle wurde die LF von MC4100 + p29 mit *beads* inkubiert, an die kein FocA Protein gebunden war, um unspezifische Bindungen auszuschließen.

Einfluss der Position des *Strep tag* am FocA Protein

Für die *in vitro* Untersuchung wurden zwei verschiedene Varianten von FocA hergestellt: mit N- bzw. C-terminalen *Strep tag*. Um den Einfluss der Position des *Strep tag* zu bestimmen wurden ebenfalls *pull-down* Analysen durchgeführt. Dazu wurde entweder das N-terminal getaggte FocA (FocA5) oder das C-terminal getaggte FocA (FocA3) an die *beads* gebunden und mit den LF der Stämme REK702 + p29 bzw. RM223 ($\Delta pflB$, $\Delta pflA$, $\Delta tdcE$) inkubiert. Die Western-Blot Analyse der Elutionsfraktionen ist in Abb. 20 zu sehen.

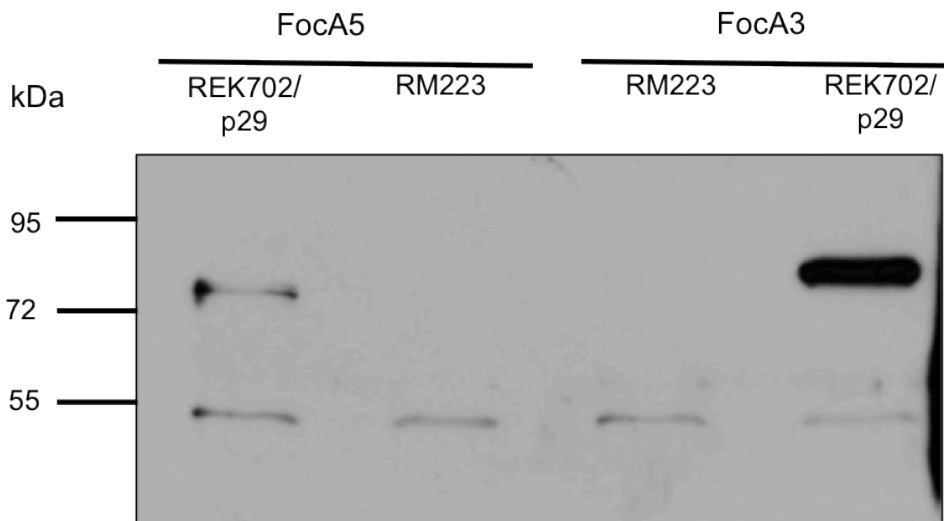


Abb. 20 Autoradiogramm nach *pull-down* Analyse von FocA5 und FocA3
 Western-Blot Analyse nach 10%iger (w/v) SDS-Page; anti-PflB AK (1:3000); 25 µl Elutionsfraktion aufgetragen

In allen Elutionsfraktionen wurde eine Bande bei ca. 55 kDa nachgewiesen, welche gleichzeitig als Ladekontrolle dient. Diese zusätzlich detektierte Bande konnten bis jetzt noch nicht identifiziert werden und sie konnte auch nicht bei jeder Western-Blot Analyse nachgewiesen werden. Wurde die LF des Stammes REK702 (+ p29) zu den *beads* gegeben, konnte eine zusätzliche Bande bei ca. 85 kDa sowohl in den Elutionsfraktionen mit FocA5 als auch FocA3 detektiert werden. Es ist allerdings deutlich, dass die Bande unter der Verwendung von FocA3 stärker ist. Die *pull-down* Analysen, bei denen der Stamm RM223 ($\Delta pflB$, $\Delta pflA$, $\Delta tdcE$) verwendet wurden, zeigten nur die Ladekontrolle bei 55 kDa.

Interaktion von FocA mit verkürztem PflB Protein

Um erste Aussagen über potentielle Interaktionsflächen der Pyruvat-Formiat Lyase PflB treffen zu können wurden die *pull-down* Analyse mit einer verkürzten Variante von PflB durchgeführt. Diese Variante ist am C-Terminus um 27 AS verkürzt und kann somit nicht mehr von dem Aktivator Protein PflA aktiviert werden. PflB₍₁₋₇₃₃₎ wurde von Dr. P. Kolenko überproduziert und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es wurden sowohl *pull-down* Analysen mit FocA5 als auch FocA3 durchgeführt. Als Vergleich diente der Versuch mit dem unveränderten PflB_{His}. Die Elutionsfraktionen wurden ebenfalls auf ein 10%iges (w/v) SDS Gel aufgetragen und mittels Western-Blot Analyse detektiert (Abb. 21).

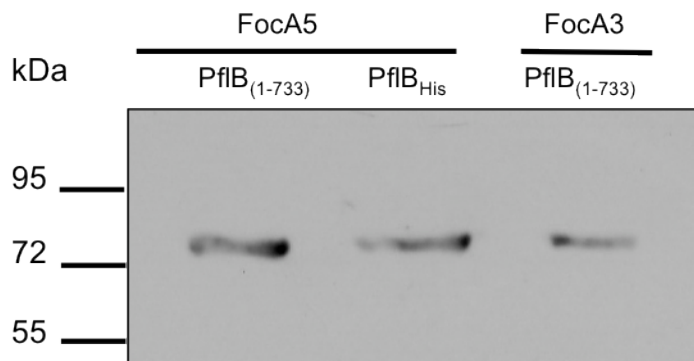


Abb. 21 Autoradiogramm der *pull-down* Analyse mit verkürztem PflB

Western-Blot Analyse nach 10%iger (w/v) SDS-Page; anti-PflB AK (1:3000); 25 µl Elutionsfraktion aufgetragen

Wie zu sehen ist konnte in allen Elutionsfraktionen eine Bande detektiert werden, die der berechneten Molekularmasse von PflB entspricht. Zwischen den einzelnen Banden konnten keine starken Unterschiede in der Intensität beobachtet werden. Dabei zeigten sich auch keine Unterschiede bei der Verwendung von FocA3 oder FocA5. Dieser Versuch zeigt, dass der C-Terminus von PflB für die Wechselwirkung mit FocA nicht erforderlich ist.

Interaktionsnachweis von FocA und TdcE

Die Primärstruktur von PflB weist eine 78%ige Identität und 91%ige Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz von TdcE auf. TdcE ist eine 2-Ketobutyrat-Formiat Lyase, die ebenfalls als Pyruvat-Formiat-Lyase fungieren kann. Daher sollte getestet werden, ob dieses Enzym auch in der Lage ist an FocA zu binden. Das rekombinante TdcE Protein wurde mit Hilfe des IMPACT (*Intein-mediated purification with an affinity chitin binding tag*) Systems gereinigt (Falke, Diplomarbeit 2010). Nach der Abspaltung des *Intein-CBD-tags* konnte das Protein für *pull-down* Analysen eingesetzt werden. Aufgrund der hohen Identität

zu PflB konnte TdcE mit dem anti-PflB AK nachgewiesen werden. Das Ergebnis der *pull-down* Analyse ist in Abb. 22 zu sehen.

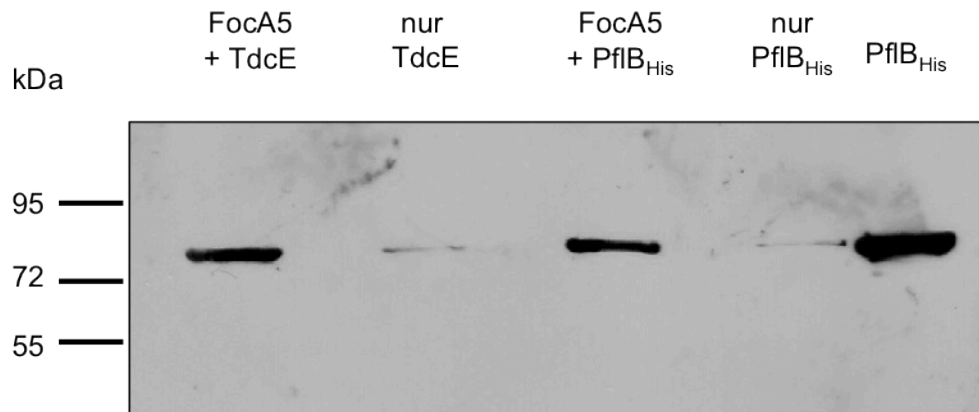


Abb. 22 Autoradiogramm nach *pull-down* Analyse mit TdcE

Western-Blot-Analyse nach 10%iger (w/v) SDS-Page; anti-PflB AK (1:3000); 25 μ l Elutionsfraktion aufgetragen

In allen Spuren konnte eine Bande bei ca. 85 kDa detektiert werden, auch in den Spuren der Elutionsfraktionen ohne FocA Zugabe zu den *beads*. Jedoch ist deutlich zu sehen, dass sowohl unter der Verwendung von gereinigtem TdcE als auch von gereinigtem PflB_{His} eine stärkere Bande nach der *pull-down* Analyse nachweisbar war. Als Kontrolle wurde gereinigtes PflB auf das Gel aufgetragen. Somit konnte auch mit TdcE eine Interaktion nachgewiesen werden.

Interaktion von FocA und PflB in Gegenwart von DDM

Zur Solubilisierung der Membran wurde das nicht-ionische Detergenz *n*-Dodecyl- β -maltosid (DDM) genutzt. Da in anderen Versuchen (z.B. ITC Messungen) schon festgestellt werden konnte, dass Detergenzien einen Einfluss auf eine mögliche Interaktion haben können, wurde nun untersucht, ob DDM einen Einfluss auf die Interaktion zwischen FocA und PflB hat. Um dies näher zu bestimmen, wurden die *pull-down* Analysen in Gegenwart von DDM (1 mM DDM im Puffer) durchgeführt. Als Protein mit *Strep tag* wurde FocA5 genutzt. Die Detektion der Elutionsfraktionen ist in Abb. 23 zu sehen. Es wurden jeweils dieselben Proben mit bzw. ohne DDM aufgetragen. Bei allen Versuchen wurden die gleichen Proteinmengen eingesetzt. Ohne Zugabe von DDM sind unter Verwendung der LF der Stämme MC4100, MC4100 + p29 und REK702 Banden in der Größe von ca. 85 kDa sichtbar. Wurde der Stamm RM223 verwendet, mit Deletionen in den Genen *pflB*, *pflA* und *tdcE*, konnte keine spezifische PflB Bande detektiert werden. Als Kontrolle wurde die LF des Stammes MC4100 + p29 zu dem *beads* gegeben ohne das diese zuvor mit FocA5 inkubiert wurden. Es zeigt sich eine leichte Bande bei 85 kDa, woraus zuschließen ist, dass eine geringe Menge an PflB auch unspezifisch an die *beads* binden kann. Wurde zu allen

Wasch- und Inkubationsschritten 1 mM DDM hinzugegeben, zeigen sich in den Elutionsfraktionen nur sehr schwache Banden (FocA5 + LF MC4100, FocA5 + REK702, FocA5 + MC4100 + p29, LF MC4100 + p29). In der Elutionsfraktion der *beads*, welche mit der LF des Stammes RM223 inkubiert wurden ist wiederum keine Bande bei 85 kDa sichtbar.

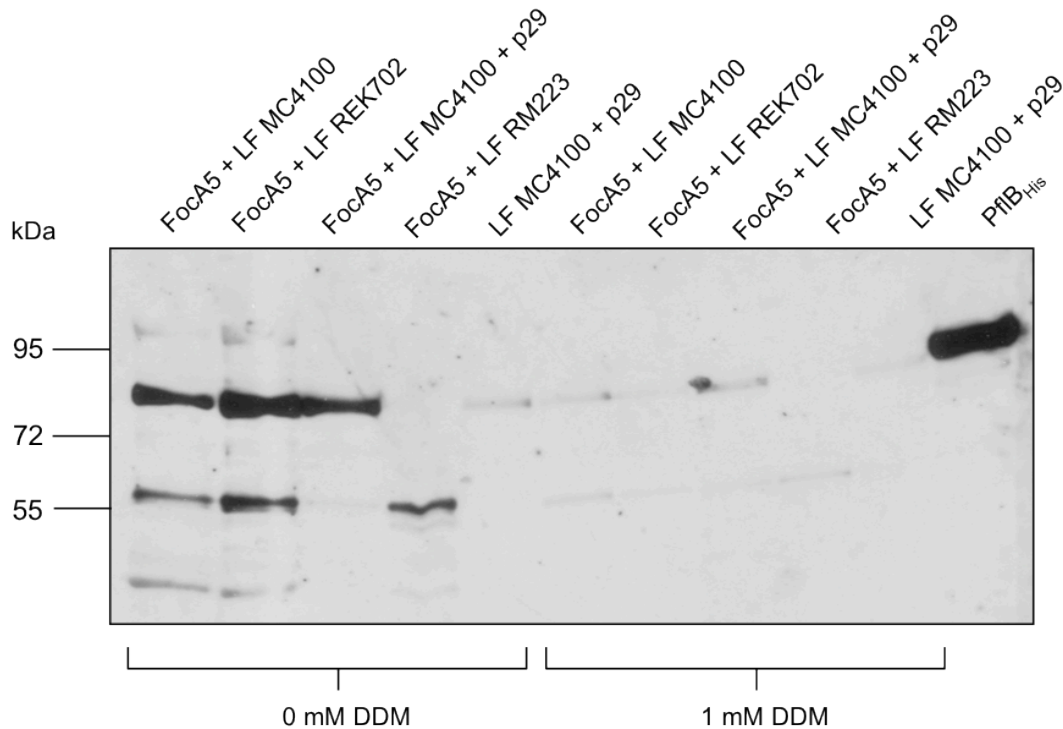


Abb. 23 Autoradiogramm der *pull-down* Analyse in Gegenwart von DDM

Western-Blot Analyse nach 10%iger (w/v) SDS-Page; anti-PfIB AK (1:3000); 25 µl Elutionsfraktion aufgetragen.

Es zeigte sich, dass die Zugabe von DDM die Interaktion zwischen FocA und PfIB schwächt, allerdings nicht vollständig verhindert.

Interaktion zwischen FocA und anderen Proteinen

Nachdem eine Interaktion zwischen FocA und PfIB gezeigt werden konnte, wurde nun untersucht, ob die putativen Glycylradikal-Enzyme PfIF und PfID ebenfalls mit FocA interagieren. Dazu wurden beide Proteine mittels Affinitätschromatographie mit His-tag aufgereinigt und für *pull-down* Analysen eingesetzt. PfID hat eine berechnete Molekularmasse von 85 kDa und PfIF eine Molekularmasse von ca. 91 kDa. Als Kontrolle wurde der Versuch mit gereinigten PfIB durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden auf eine 10%ige (w/v) SDS-Page aufgetragen und mittels Western-Blot Analyse detektiert (Abb. 24). Um alle Proteine gleichzeitig nachweisen zu können, wurde der His-tag AK verwendet.

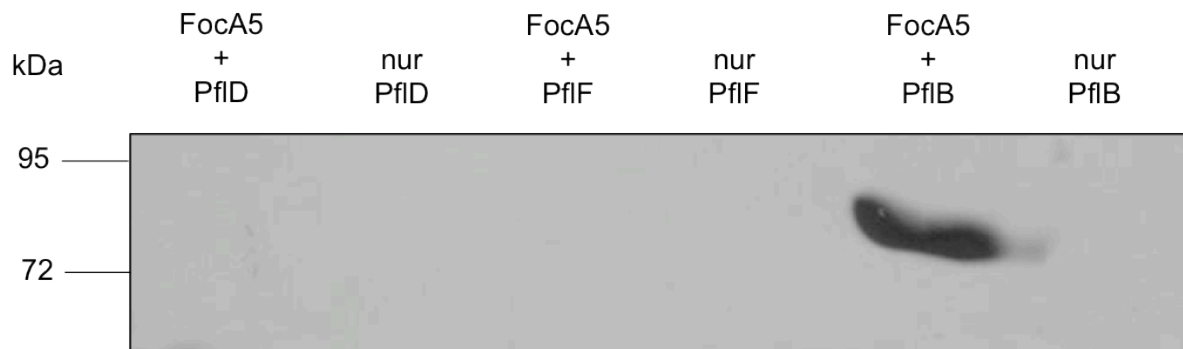


Abb. 24 Autoradiogramm nach *pull-down* Analyse mit PfID_{His} und PfIF_{His}

Western-Blot Analyse nach 10%iger (w/v) SDS-Page; His tag AK (1:2000); 25 µl Elutionsfraktion aufgetragen

Weder in den Elutionsfraktionen der *pull-down* Analysen mit PfID_{His} noch mit PfIF_{His} konnte eine Bande bei 85 kDa bzw. 91 kDa nachgewiesen werden. Die Kontrolle, in der PfIB zu FocA5 beladenen *magnetic beads* gegeben wurde, zeigte eine deutliche Bande bei 85 kDa, was der berechneten Molekularmasse von PfIB entspricht. Es konnte keine Interaktion von FocA5 mit PfID oder PfIF nachgewiesen werden.

3.6.2.3 *Far Western-Blot* Analysen

Eine weitere Methode zur Bestimmung einer Interaktion zwischen zwei gereinigten Proteinen ist die *Far Western-Blot* Analyse. Wie bereits in 2.7.13 beschrieben basiert die Methode auf der klassischen Western-Blot Analyse, wobei jedoch vor dem primären AK die Membran mit einem zweiten Protein inkubiert wird. Für die Bestätigung der Interaktion zwischen FocA und PfIB wurden zunächst die verschiedenen FocA Varianten auf eine BN-Page aufgetragen. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran und der anschließenden Blockierung der Membran wurde diese über Nacht mit 500 µg gereinigten PfIB inkubiert. Nach mehrmaligen Waschschrte wurde der PfIB AK auf die Membran gegeben, welche anschließend detektiert wurde. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 25 zu sehen.

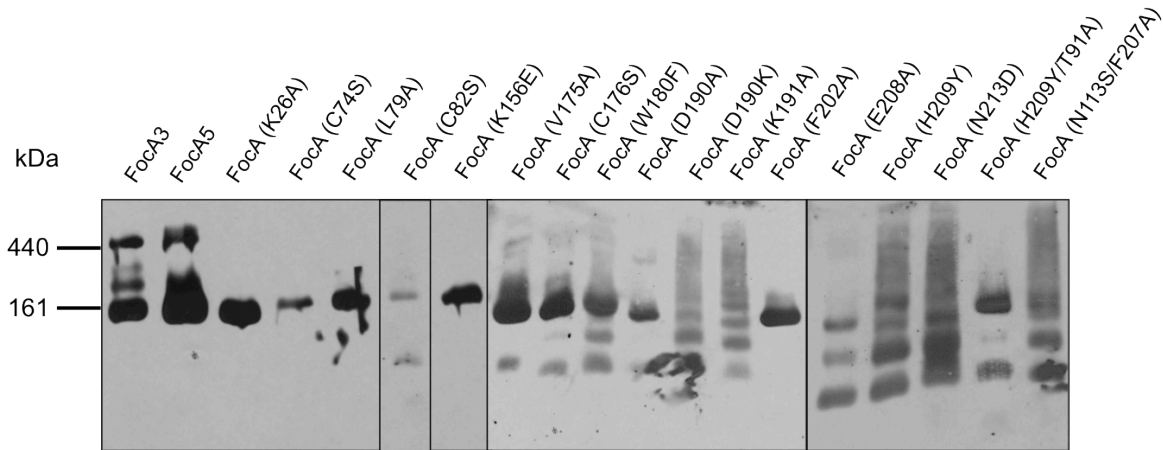


Abb. 25 Autoradiogramm nach *Far Western-Blot* Analyse einer 5-13,5%igen (w/v) BN-Page

Western-Blot Analysenach Inkubation mit 500 µg PflB_{His}; anti-PflB AK (1:3000); 1,5 µg Protein aufgetragen

In allen Spuren konnten Banden bei ca. 160 kDa mittels anti-PflB AK detektiert werden. Dies entspricht der Molekularmasse eines FocA-Pentamers, welches bereits spezifisch nachgewiesen werden konnte. Es zeigen sich zudem bei einigen Varianten Banden bei ca. 440 kDa, die einem Pentadekan entsprechen könnten (FocA3, FocA5, FocA (V175A), FocA (C176S), FocA (W180F), FocA (D190A), FocA (D190K), FocA (K191A), FocA (H209Y), FocA (N213D), FocA (N113S/F207A)). Weitere Banden, unterhalb von 161 kDa, konnten bei den Varianten FocA (C82S), FocA (V175A), FocA (W180F), FocA (D190A), FocA (D190K), FocA (K191A), FocA (E208A), FocA (H209Y), FocA (N213D), FocA (H209Y) und FocA (N113S/F207A) detektiert werden. Es zeigte sich, dass das Pentamer meist das stärkste Signal aufwies. Zudem konnten nach der *Far Western-Blot* Analyse teilweise Banden detektiert werden, welche zuvor nicht bzw. nur sehr schwach gezeigt werden konnten (z. Bsp. Pentadekan bei FocA (H209Y), FocA (N213D) und FocA (N113S/F207A)). Für weitere Kontrollen wurden in den folgenden Versuchen nur die unveränderten Varianten (FocA3 und FocA5) sowie einzelne veränderte Varianten genutzt.

Zur Kontrolle ob der anti-PflB AK allein an FocA binden kann, wurde ein *Far Western-Blot* durchgeführt, ohne die vorherige Inkubation der Membran mit PflB_{His}. Nach der Detektion konnte kein Signal nachgewiesen werden, wodurch eine unspezifische Interaktion des anti-PflB AK an FocA ausgeschlossen werden konnte (Abbildung nicht gezeigt).

Um zu zeigen, ob auch die denaturierte Form von FocA mit PflB interagieren kann, wurde die *Far Western-Blot* Analyse mit einer 12,5%igen SDS-Page durchgeführt. Dazu wurden nur einzelne Varianten des FocA Proteins verwendet. Wie in Abb. 26 zu sehen ist, ist PflB_{His} in der Lage an die denaturierte Form von FocA zu binden.

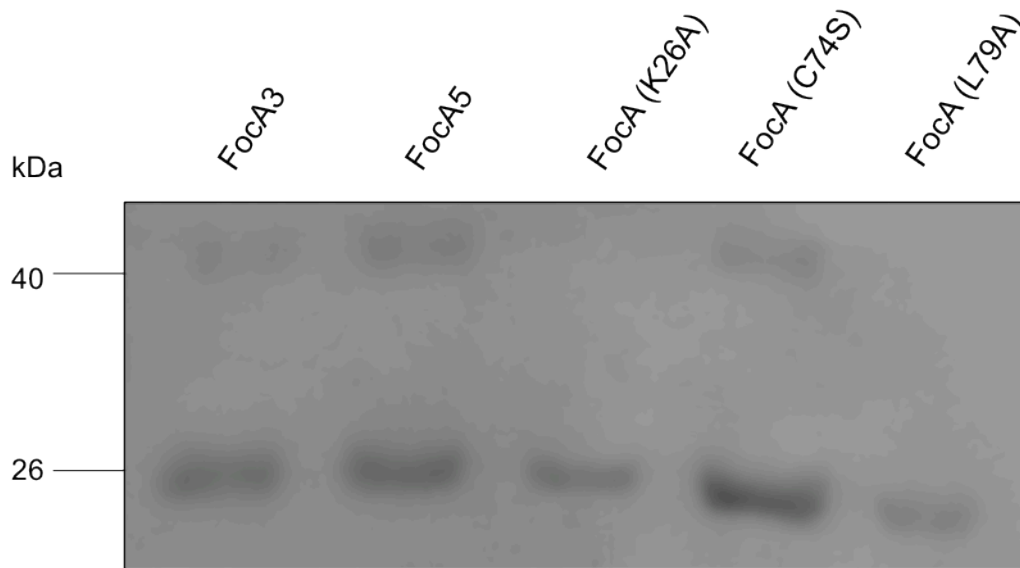


Abb. 26 Autoradiogramm nach *Far Western Blot* Analyse mit PflB_{His}

A: 12,5%ige (w/v) SDS-Page nach Inkubation mit 500 µg PflB_{His}; anti-PflB AK (1:3000); 1,5 µg Protein aufgetragen

Es zeigten sich hier keine Unterschiede in den Banden-Intensitäten bei 26 kDa zwischen den einzelnen Varianten. FocA3, FocA5 und FocA (C74S) wiesen zusätzlich eine Bande bei ca. 45 kDa auf.

In den zuvor beschriebenen *pull-down* Analysen wurde getestet, ob die Proteine PflD und PflF mit FocA interagieren. Die Proteine sollten nun ebenfalls für *Far Western*-Blot Analysen eingesetzt werden.

Zunächst wurden 5 Varianten von FocA auf ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetragen, auf eine Membran übertragen und diese anschließend mit gereinigten PflF_{His} inkubiert. Nach Inkubation mit dem anti-PflF AK wurde die Membran detektiert (Abb. 27 A).

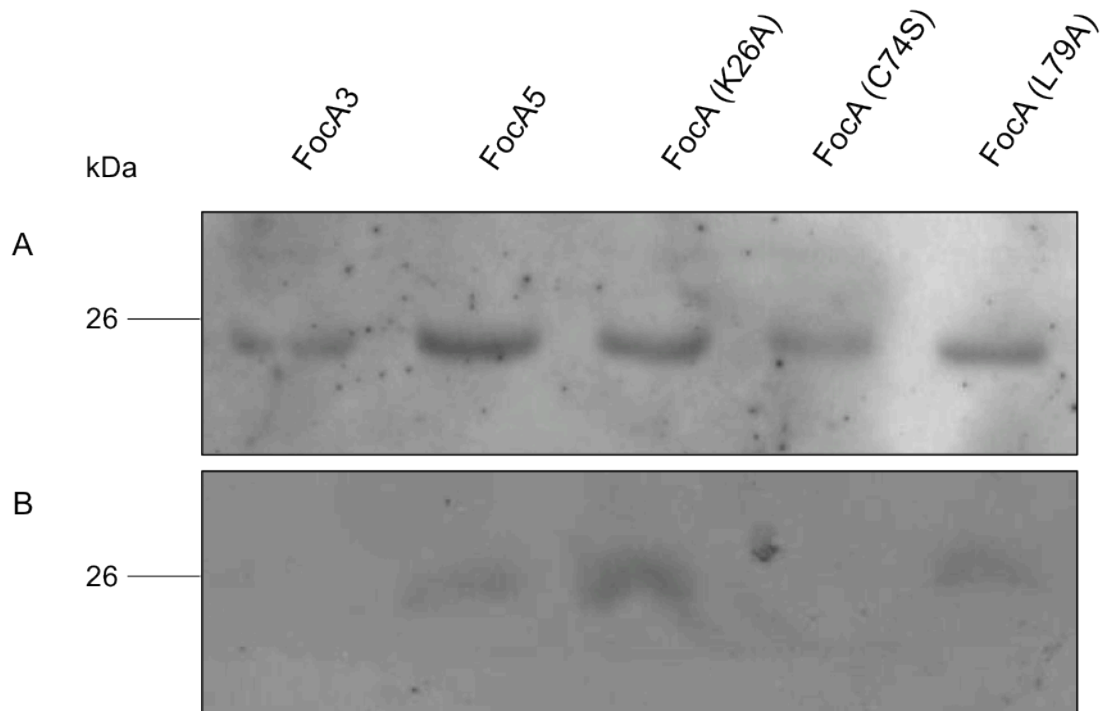


Abb. 27 Autoradiogramm nach *Far Western-Blot* Analyse mit PflF_{His}

A: 12,5%ige (w/v) SDS-Page nach Inkubation mit 500 µg PflF_{His}; anti-PflF AK (1:3000); 1,5 µg Protein aufgetragen

B: 12,5%ige (w/v) SDS-Page nach Inkubation mit anti-PflF AK (1:3000); 1,5 µg Protein aufgetragen

Wie in Abb. 27 zu erkennen ist, ist auch das PflF_{His} Protein in der Lage an FocA zu binden. Es gab hierbei keine Unterschiede in der Intensität der einzelnen Banden. Um auszuschließen, dass der anti-PflF AK an FocA bindet, wurde ein weiterer *Far Western-Blot* durchgeführt, wobei die Membran nicht mit PflF_{His} inkubiert wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 27 B zu sehen. Es zeigen sich deutliche Banden bei FocA5, FocA (K26A) und FocA (L79A). Dies lässt schlussfolgern, dass der anti-PflF AK unspezifisch an FocA binden kann. Dennoch ist zu bemerken, dass die Intensität der Banden in Abb. 27 B geringer ist.

Als weitere Kontrolle sollte der Versuch mit gereinigtem PflD_{His} und HypF_{His} (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Mario Brausemann) durchgeführt werden. Mit diesem Versuch sollte nochmals sichergestellt werden, dass FocA nicht unspezifisch alle Proteine bindet. Daher wurde mit beiden Proteinen jeweils ein *Far Western-Blot* einer SDS-Page angefertigt. Wie auch bei dem Versuch mit PflB_{His} wurden 500 µg gereinigtes Protein eingesetzt. Da für diese Proteine keine spezifischen AK vorhanden waren, wurde der anti-His-tag AK genutzt. Als Kontrolle wurde das jeweilige Protein aufgetragen, um zu zeigen, dass die Detektion erfolgreich war. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 28 zu sehen.

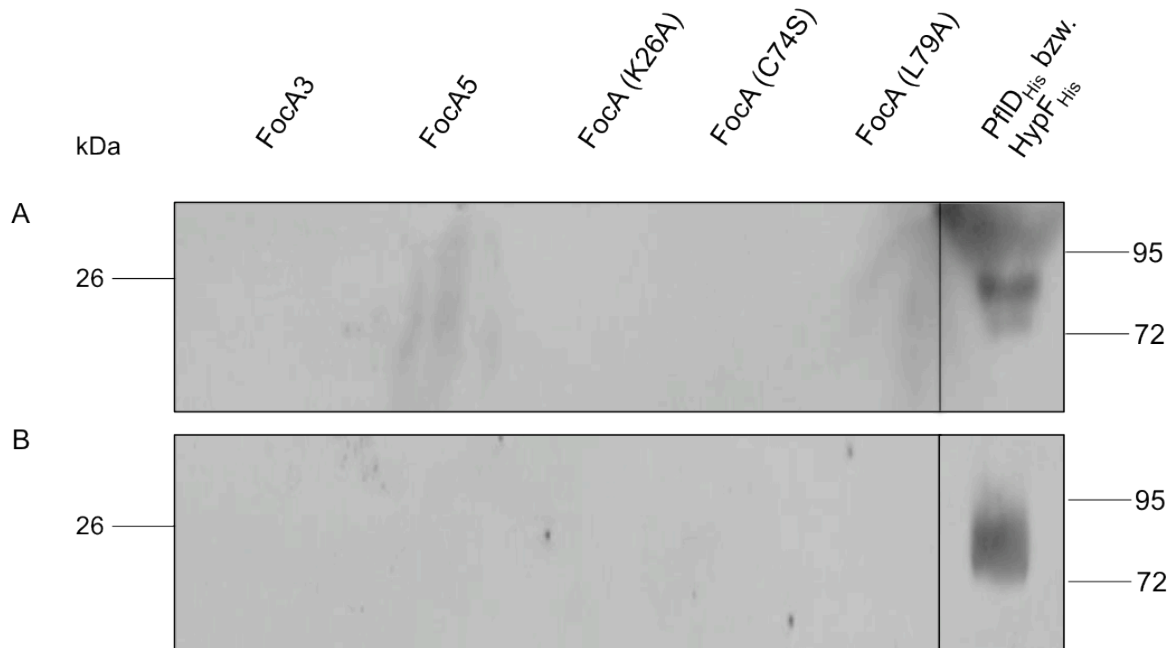


Abb. 28 Autoradiogramm einer *Far Western-Blot Analyse* mit PflD_{His} und HypF_{His}

A: 12,5%ige (w/v) SDS-Page nach Inkubation mit 500 µg PflD_{His}; anti-His-*tag* AK (1:5000); 1,5 µg Protein aufgetragen

B: 12,5%ige (w/v) SDS-Page nach Inkubation mit 500 µg HypF_{His}; anti-His-*tag* AK (1:5000); 1,5 µg Protein aufgetragen

Wie in Abb. 28 zu erkennen ist konnte weder eine Interaktion mit PflD_{His} (A) noch mit HypF_{His} (B) nachgewiesen werden, da keine FocA spezifischen Banden mit Hilfe des anti-His-*tag* AK detektiert wurden. Als Kontrolle konnte jedoch das aufgetragene PflD_{His} bei einer Größe von 85 kDa nachgewiesen werden, welche der berechneten Molekularmasse entspricht. Ebenfalls konnte eine Bande bei ca. 82 kDa detektiert werden, die der Molekularmasse von HypF_{His} entspricht (Abb. 28 B). Somit konnte gezeigt werden, dass weder PflD_{His} noch HypF_{His} mit FocA auf einer Membran interagieren.

3.6.3 *In vivo* Untersuchung zur Interaktion zwischen FocA und PflB

3.6.3.1 Klonierung in die Plasmide pUT18/pUT18C und pKT25/pKNT25 des BACTH Systems

Um Interaktionsstudien zwischen FocA und PflB durchführen zu können, mussten zunächst die Gene *focA* und *pflB* der einzelnen Proteine in die Vektoren des BACTH Systems kloniert werden. Das Gen *focA* wurde hierbei in die Plasmide pKT25 und pKNT25 kloniert, welche für eine N- bzw. C-terminale Fusion von T25 an FocA codieren. Das Gen, welches für PflB codiert, wurde in die Vektoren pUT18 und pUT18C kloniert. Es wurde sowohl das gesamte Gen von *pflB* als auch einzelne Teile kloniert, da verhindert werden sollte, dass es durch die Größe von PflB nicht zur Verhinderung einer Komplementation kommt. Die einzelnen Konstrukte, sowie die in PflB gekennzeichneten Regionen sind in Abb. schematisch dargestellt.

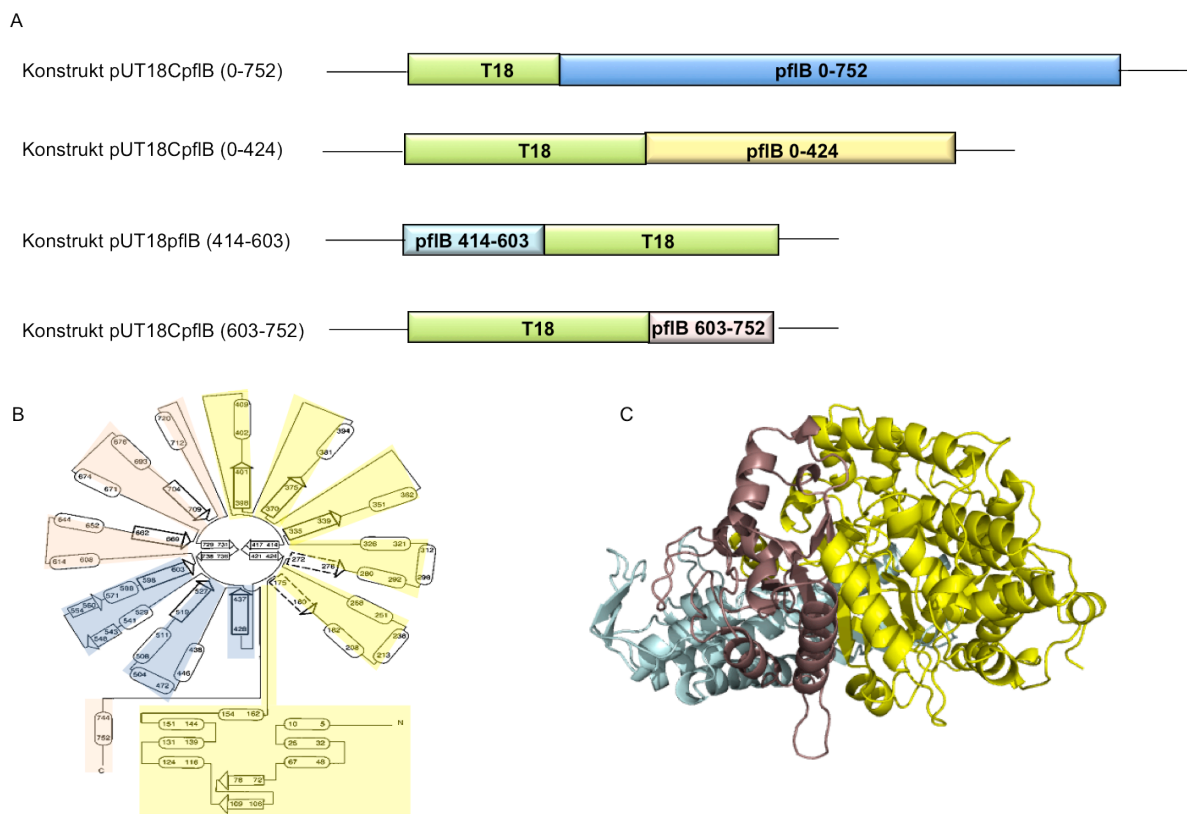


Abb. 29 Darstellung der verschiedenen Konstrukte von *pflB* für das BACTH System

A: Anordnung der Gene in den verschiedenen Plasmiden, welche für das BACTH System eingesetzt wurden

B: Schematische Darstellung eines PflB Monomers; eingefärbt sind die verschiedenen Bereich deren Gensequenz in die Plasmide kloniert wurde (Becker *et al.*, 1999)

C: Kristall-Struktur des PflB Monomers; PDB: 2PFL; 2,9 Å (Becker *et al.*, 1999) Die verschiedenen Bereiche sind jeweils farbig gekennzeichnet, um deren Lage in dem Modell und der Kristallstruktur aufzuzeigen

Die Position des Fusion-Proteins wurde so gewählt, dass die Fusion möglichst die Domänstruktur des Fragmentes nicht beeinflusst.

3.6.3.2 Auswertung des BACTH Systems

Zunächst wurden die Plasmide in unterschiedlichen Kombinationen in den *E. coli* Stamm DHM1 cotransformiert und auf selektivem Medium ausplattiert. Auf McConkey Platten, welche bei einer Interaktion zwischen FocA und PflB rote Kolonien zeigen sollten, konnten rosa Kolonien nachgewiesen werden. Dabei unterschied sich die Anzahl der Kolonien dahin gehend, dass wenn das Plasmid pKNT25focA (T25 C-terminal an FocA fusioniert) genutzt wurde mehr Kolonien beobachtet werden konnten. Die Positiv-Kontrolle (zwei Plasmide (pUT18C-zip und pKT25-zip), die für Gene codieren, deren Genprodukte miteinander interagieren) zeigte rote Kolonien und die Negativ-Kontrolle (pUT18C-zip und pKT25focA) zeigte nur weiße Kolonien. Auch nach der Selektion auf X-gal haltigen LB-Platten konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Kombinationen gezeigt werden. Daher wurden jeweils 3 Klone pro Platte erneut ausgestrichen und in jeweils einer Übernachtskultur angezogen. Jeweils 3 Röhrchen pro Übernachtskultur wurden anaerob in TGYEP-Medium bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,7 angezogen. Anschließend wurde von jedem Röhrchen eine 3-fach β -Galaktosidase-Bestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 30 dargestellt.

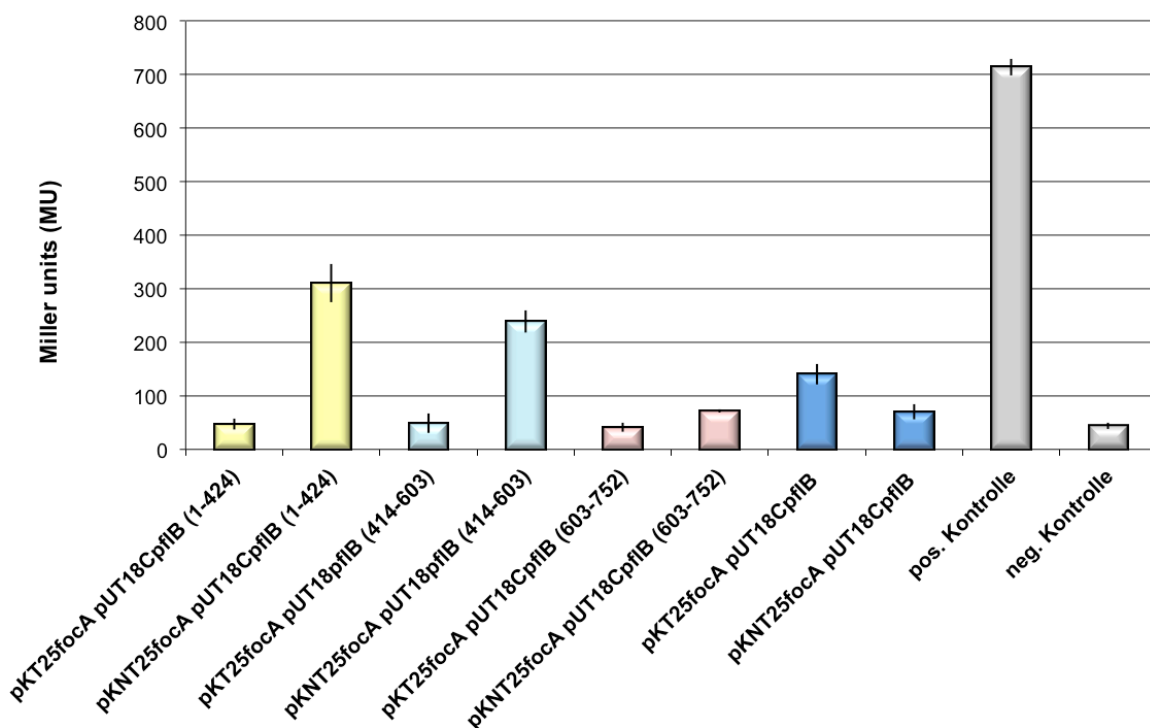


Abb. 30 β -Galaktosidase Aktivitäten des *Bacterial Two Hybrid Systems*

DHM1 mit transformierten Plasmiden angezogen anaerob bei 37 °C in TGYEP-Medium; pH 6,85

Es wurden für die Berechnung der β -Galaktosidase Aktivität die Mittelwerte aus je 9 Messungen bestimmt und die entsprechende Standardabweichung angegeben. Jeder Versuch wurde mind. 3-fach wiederholt. In Abb. 30 ist ein Beispiel einer Messung gezeigt. Alle anderen Messungen unterschieden sich lediglich in der Höhe der β -Galaktosidase-Aktivität, jedoch nicht in der Tendenz. Das Verhältnis zwischen den einzelnen Kombinationen blieb immer gleich. Wie in Abb. 30 zu erkennen ist, zeigt die Positiv-Kontrolle die höchste Aktivität mit ca. 720 MU, die Negativ-Kontrolle hat eine Aktivität von ca. 50 Miller Einheiten. Ähnlich der Negativ-Kontrolle verhalten sich die Kombinationen pKT25focA + pUT18CpflB (1-424), pKT25focA + pUT18pflB (414-603), pKT25focA + pUT18CpflB (603-752), pKNT25focA + pUT18CpflB (603-752) und pKNT25focA + pUT18CpflB. Auffällig ist das es sich hierbei meistens um Kombinationen handelt in denen FocA eine N-terminale Fusion mit T25 hat. Deutliche Aktivitäten konnten bei den Kombinationen pKT25focA + pUT18CpflB (1-424) und pKT25focA + pUT18pflB (414-603) nachgewiesen werden. Ein geringer Unterschied zeigte sich bei der Kombination aus den Plasmiden pKT25focA + pUT18CpflB. Daher konnte gezeigt werden, dass sowohl die AS 1-424 als auch die AS 414-603 von PflB mit FocA interagieren, wenn der N-Terminus von FocA zugänglich ist. Wurde das gesamte PflB-Protein eingesetzt, konnte auch mit der N-terminalen Fusion von T25 an FocA eine Interaktion gezeigt werden, welche jedoch deutlich geringer war. Diese geringe Aktivität könnte auch darin begründet sein, dass die Größe des PflB-Proteins eine Interaktion der Cyclase Untereinheiten reduziert. Die AS 603-752 von PflB, welche u.a. die wichtigen AS für die Bildung des Glycyl-Radikals beinhalten, scheinen keine Interaktion mit FocA zu zeigen. Mit diesem System konnte auch *in vivo* eine Interaktion zwischen FocA und PflB nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Einfluss einzelner Aminosäure-Austausche auf die Stabilität des FocA-Proteins und die Translokation von Formiat über die Membran

Obwohl in den letzten Jahren immer mehr Mitglieder der Formiat-Nitrit-Transporter (FNT)-Familie (Klasse 2.A.44 nach der Transport *Classification Database*, (Saier *et al.*, 1999)) strukturell aufgeklärt wurden, gibt es bis heute keine eindeutigen Hinweise über die Wechselwirkungen der einzelnen Monomere im Pentamer des FocA-Proteins. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur von FocA konnten erste Hinweise auf allgemeine Eigenschaften und einen möglichen Mechanismus der Formiattranslokation gegeben werden (Lü *et al.*, 2011; Waight *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009). Im Folgenden ist nun eine Übersicht über die veröffentlichten Kristallstrukturen, sowie den postulierten Mechanismus dargestellt (Tabelle 11).

Tabelle 11 Übersicht der veröffentlichten Kristallstrukturen von FocA

Organismus	Auflösung	N-Terminus	Model der Formiattranslokation	Autor (Jahr)
<i>Escherichia coli</i>	2,25 Å	N-Terminus verkürzt (nur AS 28-285)	Engstellenbildung in monomerer Pore durch AS-Paare: F75/F202 und L79/L89	Wang <i>et al.</i> (2009)
<i>Vibrio cholera</i>	2,13 Å	ungeordnete Struktur	Engstellenbildung in monomerer Pore durch AS-Paar H208/T90	Waight <i>et al.</i> (2010)
<i>Salmonella typhimurium</i>	2,8 Å	3 verschiedene Strukturen beobachtet	pH-abhängige Konformationsänderung	Lü <i>et al.</i> (2011)

Die Unterschiede in den Strukturen beziehen sich hierbei nicht nur auf den zu untersuchenden Organismus, sondern auch auf die Vorhersage eines möglichen Translokationsmechanismus. Dabei zeigte sich, dass sowohl Wang *et al.* als auch Waight *et al.* (2010) einen Mechanismus vorschlugen der eine Engstellenbildung vorsieht. Jedoch unterscheiden sich hierbei die beteiligten Aminosäuren. Während Wang *et al.* ihren Mechanismus durch eine Untersuchung auf durch Wasserstoffbrückenbindungen gebildete Engstellen in der monomeren Pore zwischen den AS F75/F202 und L79/L89 stützen, postulieren Waight *et al.* (2010) eine Engstellenbildung zwischen anderen Aminosäuren (H208 und T90). In Abb. 31 ist dieser Mechanismus dargestellt. Die Bindung könnte durch die Anwesenheit von 2 dissoziierten Formiatmolekülen (FMT1 +FMT2) im selektiven Filter gelöst werden, indem ein Formiatmolekül (FMT2) die Position der AS T90 einnimmt und

über eine Wasserstoffbrückenbindung mit H208 interagiert.

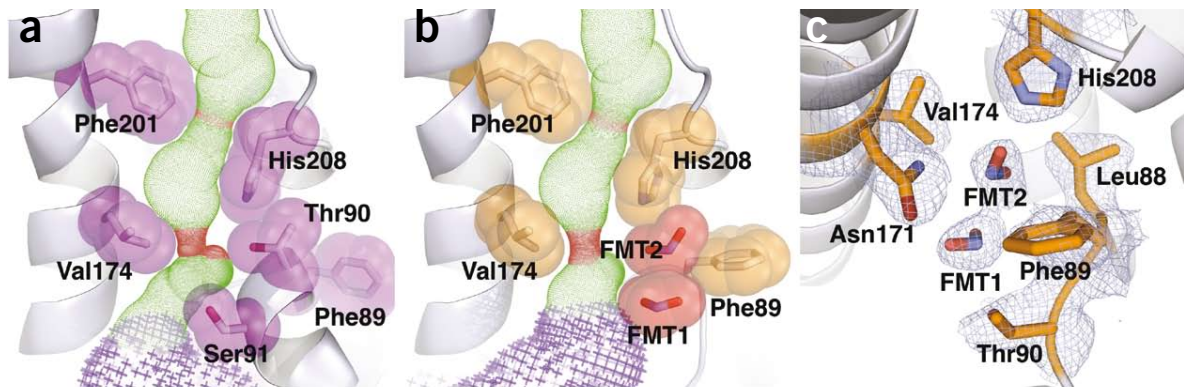


Abb. 31 Postulierter Mechanismus der Formiattranslokation in *V. cholerae* nach Waight *et al.*, 2010

A: His208 und T90 interagieren durch eine Wasserstoffbrückenbindung; B) zwei Formiatmoleküle (FMT1 und FMT2) sind im selektiven Filter lokalisiert; C) FMT2 geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit His208 ein und übernimmt die Position von T90; damit ist der Kanal offen für die Translokation weiterer Formiatmoleküle; Die AS H208 und T90 entsprechen den AS des FocA-Proteins aus *E. coli* H209 und T91

Da die AS T90 in der Ω -Schleife von FocA lokalisiert ist und somit in der Mitte der Pore liegt, wird von Waight *et al.* (2010) postuliert, dass dieser Mechanismus stark von der Flexibilität der Ω -Schleife abhängig ist. In dieser Arbeit wurde die Funktion verschiedener AS des FocA Proteins untersucht, indem diese AS durch andere AS ausgetauscht wurden. Durch die indirekte Messung des internen Formiat spiegels konnten mehrere AS identifiziert werden, welche eine Rolle in der Formiattranslokation zu haben scheinen. Unter Anderem wurde auch die AS H209 (die korrespondierende AS in *E. coli* zu H208 aus *V. cholerae*) untersucht. In β -Galaktosidase-Aktivitäts-Messungen im *E. coli* Stamm DH201, welcher nicht in der Lage ist intern Formiat zu bilden, zeigte ein Austausch des Histidins an Position 209 zu einem Tyrosin eine Senkung der internen Formiatmenge. Dieser Unterschied könnte zum Beispiel in einem verringertem Import oder einem gesteigerten Export von importierten Formiat begründet sein. Die Untersuchungen im Stamm DH701 ohne Formiatzugabe zeigten eine erhöhte Menge an Formiat in der Zelle. Geht man von einem unterschiedlichen Mechanismus für den import sowie für den Export aus, würden sich die Ergebnisse widersprechen, da das Ergebnis im Stamm DH701 für einen verringerten Export bzw. einen gesteigerten Reimport von Formiat spricht. Wenn Import und Export jedoch gleich funktionieren wäre es auch möglich, dass die OH-Gruppe, welche durch das Tyrosin eingeführt wurde, den Transport durch die Pore verlangsamt. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse sollte allerdings nicht außer Betracht gelassen werden, dass es neben FocA noch mindestens einen weiteren Formiat-Translokator in *E. coli* gibt (Suppmann & Sawers, 1994). Da bisher dieser Translokator noch nicht identifiziert werden konnte, ist es schwer eine Aussage über die genaue Funktion der AS H209 im FocA-Protein in *E. coli* zu treffen.

In der Diplomarbeit von D. Hunger (2012) wurde die Funktion der AS T91 (korrespondierende AS in *E. coli* zu T90 in *V. cholerae*) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der Aminosäure Threonin an Position 91 zu Alanin zu einem gesteigerten Import von Formiat führt. Eine Variante mit beiden Austauschen (H209Y/T91A), zeigte sowohl im Stamm DH201 als auch im Stamm DH701 eine verringerte β -Galaktosidase-Aktivität, was auf einen verringerten Import, als auch auf einen gesteigerten Export schließen lässt (Abb. 14 + 15). Dabei sollte beachtet werden, dass durch die Austausche zu Tyrosin bzw. zu Alanin eine Wasserstoffbrückenbindung verhindert werden könnte, bzw. die Distanz zwischen den AS verringert wird. Damit wäre zumindest der gesteigerte Export erklärbar. Somit konnte gezeigt werden, dass die AS H209 und T91 auch in *E. coli* an der Formiattranslokation beteiligt zu sein scheinen, was die Theorie von Waight *et al.* (2010) unterstützen würde. Die These, dass die AS H209 an der Translokation beteiligt ist, konnte vor Kurzem auch durch Simulationsstudien gezeigt werden (Feng *et al.*, 2012).

Da von Wang *et al.* (2009) ein Mechanismus vorgeschlagen wurde, welcher auf den Kristallisationsergebnissen und *in vitro*- Analysen von FocA aus *E. coli* beruht, wurden auch in der hier vorliegenden Arbeit einige AS untersucht, die am Mechanismus beteiligt zu sein scheinen. Wie bereits erwähnt postulieren Wang *et al.* (2009) eine Bildung eines selektiven Filters durch Engstellenbildung in der Pore des Monomers. Dabei wurden 4 AS näher untersucht: F75, F202, L79 und L89. Die Orientierung dieser AS, sowie die gebildete Engstelle sind in Abb. 32 zu sehen.

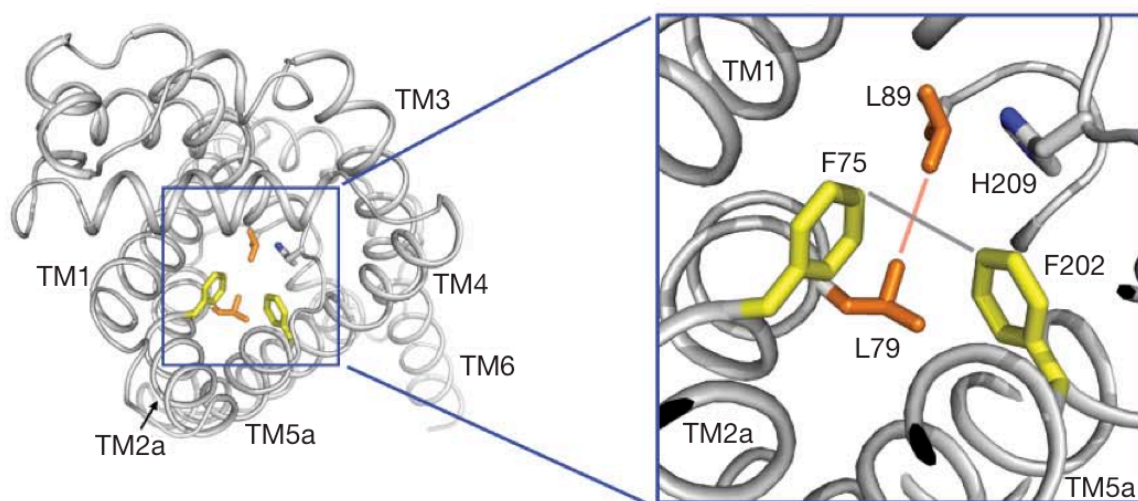


Abb. 32 Darstellung der Engstellen im selektiven Filter des FocA-Proteins aus *E. coli* (Wang *et al.*, 2009)

Gezeigt ist die räumliche Darstellung der AS im Monomer, dabei beträgt die Entfernung zwischen F75 und F202 1,8 Å und zwischen L79 und L89 1,35 Å

Es konnte gezeigt werden, dass diese AS eine Engstelle von 1,8 Å bzw. 1,35 Å bilden, welche zu schmal wäre um Wasser oder Formiat zu translozieren. Daher wurde von Wang *et al.* geschlussfolgert, dass die gezeigte Kristallform wahrscheinlich die geschlossene Form von FocA darstellt. Es war in dieser Arbeit nicht möglich einen AS-Austausch an der Position 75 zu erzeugen, weshalb die benachbarte AS C74 näher charakterisiert wurde. Messungen der internen Formiatkonzentration zeigten, dass ein Austausch der AS F202 zu Alanin und L79 zu Alanin zu einer verringerten Menge an Formiat in der Zelle führt. Dabei sollte beachtet werden, dass der Austausch eines Phenylalanin zu einem Alanin keine Unterschiede in der Polarität aufweist, allerdings große Unterschiede in der räumlichen Struktur. Der Austausch des Leucin zu einem Alanin führt zur Änderung der Polarität. Der Austausch des Cystein an Position 74 zeigte hingegen keinen Unterschied in der gemessenen β -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp, so dass gezeigt werden konnte, dass ein Austausch einer benachbarten AS keinen Einfluss auf die Translokation von Formiat ausübt. Möglicherweise wird bei diesen Varianten importiertes Formiat sofort wieder aus der Zelle exportiert.

Die Funktion der AS Leucin 89 wurde in der Diplomarbeit von D. Hunger näher untersucht. Darin konnte festgestellt werden, dass ein Austausch dieses Leucins zu einem Alanin keine eindeutigen Auswirkungen auf die Aktivität von FocA hatte. Daher konnten mit der Methode der indirekten Formiatmessung auch die Ergebnisse von Wang *et al.* teilweise bestätigt werden. Auch durch Untersuchungen am HSC-Protein aus *C. difficile* (Bry & Wang, 2012) konnte gezeigt werden, dass auch dieses Protein einen hoch konservierten Bereich besitzt der eine Ω -Schleife bilden könnte. Die AS L82 und F194 zeigten in Austausch-Varianten einen deutlich erhöhten Formiatimport. Die Variante mit einem Austausch am Threonin 84 (korrespondierende AS zu T91 aus *E. coli*) zeigte hingegen keinen eindeutigen Effekt in der Formiataufnahme. Daher kann geschlussfolgert werden, dass AS der Ω -Schleife wichtig für die Translokation von Formiat zu sein scheinen. Es konnte allerdings noch nicht 100%ig bestätigt werden, welche AS im Einzelnen daran beteiligt sind. Eine Variation dieser AS in den verschiedenen Organismen ist dabei nicht auszuschließen.

Eine weitere Region im FocA-Protein war auffällig. Die AS D190 und K191 liegen in der transmembranen Helix 5a, einer unterbrochenen Helix in der die jeweiligen AS dem Cytoplasma zugewandt sind (Abb. 33). Austausche der AS Aspartat 190 zu einem Alanin bzw. einen Lysin wiesen starke Unterschiede zu einander auf. Die Bestimmung des internen Formiat-Levels im Stamm DH201 zeigt einen starken Anstieg der Formiatmenge in der Zelle, wenn das Aspartat zu einem Alanin ausgetauscht wurde. Erfolgte jedoch der Austausch der sauren AS Aspartat zu einer basischen AS (Lysin) resultierte dies in einem

stark verringertem Formiat Spiegel in der Zelle. Untersuchungen im Stamm DH701 zeigten, dass alle Austausche sich gleich verhielten, sobald Formiat intern produziert wurde. Dies deutet darauf hin, dass durch den Austausch zu Alanin die Aufnahme von Formiat gesteigert wurde. Ersetzte man dieselbe AS jedoch durch eine basische AS, veränderte also die Ladung, wurde die Formiataufnahme in die Zelle verringert. Eine Verringerung der Formiataufnahme konnte ebenfalls durch den Austausch des benachbarten Lysins 191 zu einem Alanin gezeigt werden. Auch in diesen Fall wurde die Ladung verändert. Die Lage dieser AS im FocA-Pentamer ist in Abb. 33 gezeigt.

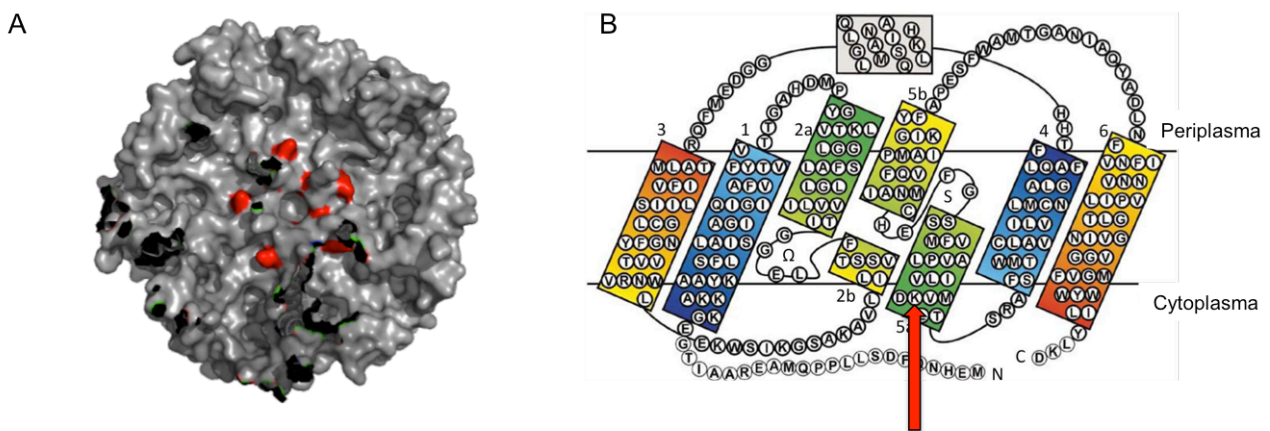


Abb. 33 Darstellung der Lokalisation von D190 und K191 im FocA Protein

A: Darstellung der Oberflächenstruktur eines FocA Pentamers aus *E. coli* von cytoplasmatischer Sicht; PDB: 3KCV; 3,2 Å Wang *et al.* (2009). Die roten Stelle zeigen die Positionen von D190 und K191.

B: Topologie Diagramm des FocA Monomers aus *V. cholerae* nach Waight *et al.* (2010); Pfeil markiert die Position der AS 190 und 191

Auffällig ist hierbei, dass beide AS an der Oberfläche von FocA liegen und somit auch zugänglich wären für mögliche Interaktionspartner wie z. B. die Pyruvat-Formiat-Lyase PflB in *E. coli*. Werden verschiedene Alignments zwischen FocA-Proteinen aus unterschiedlichen Organismen betrachtet, ist auffällig (Abb. 37, Anhang), dass besonders in der Gruppe der *Enterobacteriaceae* die AS D190 stark konserviert ist. Alle bereits identifizierten FocA-Proteine aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae* besitzen an Position 190 ein Aspartat und an Position 191 ein Lysin. Zudem ist zu bemerken, dass alle Vertreter dieser Gruppe, welche ein FocA-Protein synthetisieren auch eine Pyruvat-Formiat-Lyase besitzen. Bei anderen Vertretern der *Proteobacteria* ist meist nur das Lysin an Position 191 konserviert und nur einige Ausnahmen haben ein konserviertes Aspartat. Auch bei den meisten Vertretern der *Archea* zeigt sich eine Konservierung des Lysins, allerdings nicht des Aspartats (Abb. 37, Anhang). Da in den Untersuchungen im Stamm DH701 keine Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten gezeigt werden konnten, kann nicht eindeutig gesagt werden, ob diese AS an der Interaktion mit PflB beteiligt sind, bzw. ob

einzig und allein der Austausch einer einzelnen AS die Translokation beeinflussen könnte. Weitere Hinweise könnten durch Translokationsstudien in Liposomen oder künstlichen Membranen gewonnen werden. Da es sich hierbei um einen *in vitro* Versuch handeln würde, wäre klar zu zeigen, ob ein Austausch nur den Import oder Export betrifft, da Reimporte oder Reexporte ausgeschlossen werden können.

In Abb. 34 ist zusammenfassend dargestellt, welche AS wahrscheinlich einen Einfluss auf den Import bzw. Export von Formiat zeigen. Zudem ist die Lage einzelner AS in der Kristallstruktur und im Alignment.

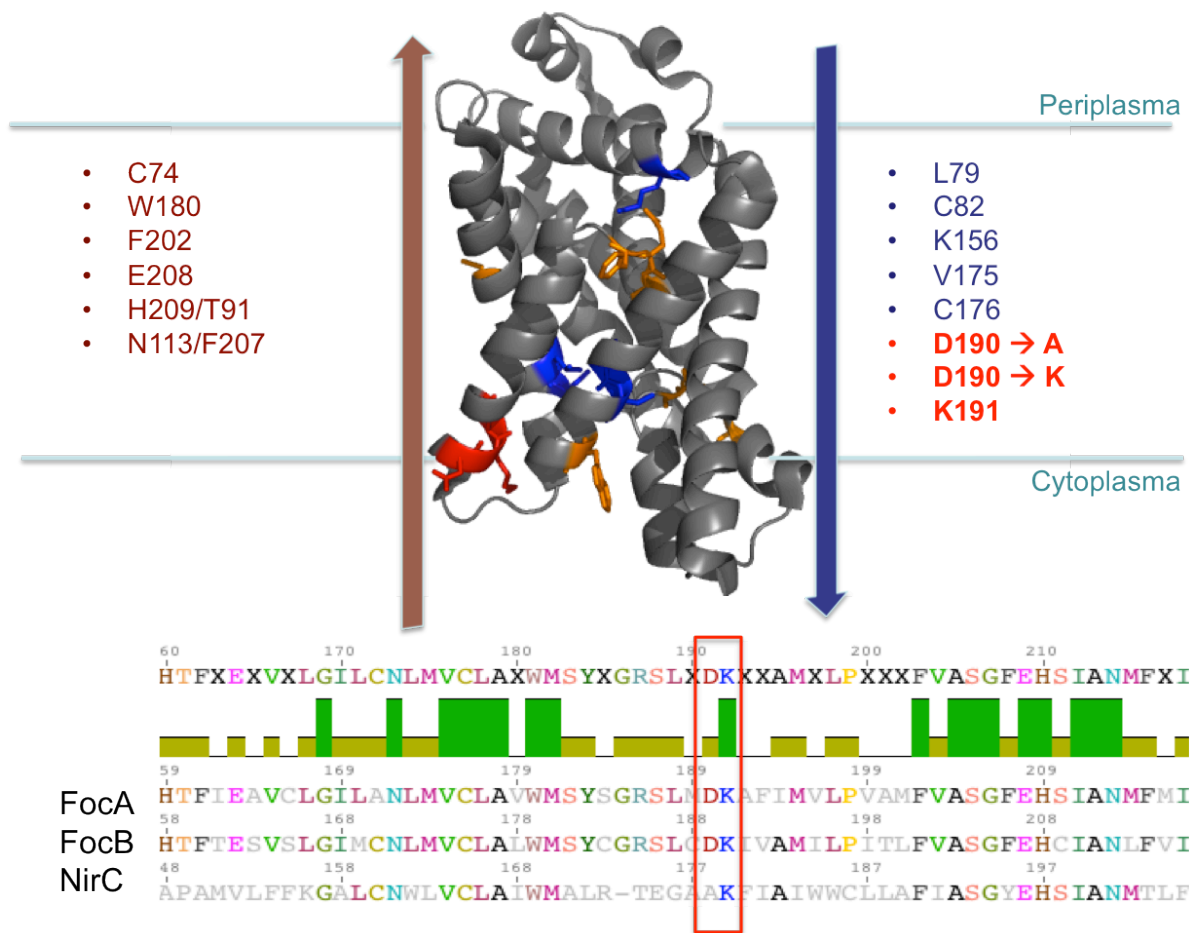


Abb. 34 Zusammenfassende Darstellung des Einflusses einzelner AS auf die Formiattranslokation

Brauner Pfeil: Export; blauer Pfeil Import; In der Kristallstruktur sind die entsprechenden AS eingefärbt

Die Variante N213D ist in dieser Abbildung nicht dargestellt, da sie keiner der beiden Transport-Richtungen spezifisch zugeordnet werden kann. Im Stamm DH201 wies sie eine verringerte β -Galaktosidase-Aktivität als der Leervektor auf, was auf einen gehemmten Import oder einen gesteigerten Export von zuvor importierten Formiat schließen würde. Betrachtet man allerdings die Aktivität im Stamm DH701, so weist die Variante N213D eine sehr hohe Aktivität auf, welche auf einen gehemmten Export bzw. gesteigerten Reimport von bereits exportierten Formiat deutet. In dieser AS-Austausch Variante könnten auch

sowohl der Import, als auch der Export gestört sein. Betrachtet man die Lage der AS N213 in der Kristallstruktur von FocA, so zeigt sich, dass N213 Teil einer α -Helix ist, welche in der zentralen Pore liegt. Somit wäre die Vermutung, dass N213 an der Regulation der Porenöffnung beteiligt ist und somit die Schließung bzw. Öffnung des Kanals beeinflusst, nicht auszuschließen.

Ebenfalls auffällig waren in dieser Arbeit die unterschiedlichen Quartärstrukturen der verschiedenen FocA Varianten. In *Blue-Native*-Gel-Analysen konnten für die verschiedenen Varianten sowohl Pentamere, Tetramere, Trimere, Dimere, Monomere als auch ein Pentadekan nachgewiesen werden. Je nachdem welcher Antikörper (AK) verwendet wurde, konnten unterschiedliche Banden in Western-Blot Analysen nachgewiesen werden (Abb. 12). So konnten zum Beispiel unter Verwendung der *Streptactin*-HRP Konjugates (detektiert den *Strep-tag* am N-Terminus von FocA) nur das Pentamer oder kleinere Oligomer-Formen nachgewiesen werden. Besonders auffällig waren hierbei die Varianten FocA (E208A), FocA (H209Y), FocA (N213D), FocA (H209Y/T91A) und FocA (N113S/F207A) bei welchen nur das Pentamer gezeigt werden konnte, obwohl verschiedene Oligomere auch in der Coomassie gefärbten Page sichtbar waren. Verwendete man den AK 8075, welcher AS der periplasmatischen Schleife erkennt, konnten alle Formen von FocA detektiert werden. Anhand dieser Ergebnisse könnte man schlussfolgern, dass der N-Terminus in manchen Oligomeren nicht mehr zugänglich ist und somit nicht detektiert werden konnte.

Da bisher nur die Quartärstruktur des Pentamers gezeigt werden konnte, war es interessant zu sehen, dass einzelne AS Austausche große Unterschiede in der Quartärstruktur bewirken. Dies konnte auch schon von D. Hunger in ihrer Diplomarbeit (2012) an AS des Ω -Schleife gezeigt werden. Unabhängig von der Position der ausgetauschten AS in der Schleife zeigten sich unterschiedliche Quartärstrukturen (G86, F90, T91, A99 und W107). So zeigten sich bei den Varianten von D. Hunger neben dem Pentamer auch Monomere, Dimere, Trimere und Tetramere. Denkbar wäre hier, dass der Austausch einzelner AS dazu führt, dass eventuell wichtige Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Monomeren geschwächt sind und somit das Pentamer leichter in seine einzelnen Untereinheiten zerfällt. Da bis heute noch kein Mechanismus gezeigt werden konnte, wie das FocA-Protein in die Membran integriert wird, wäre es auch denkbar, dass durch einzelne AS-Austausche die korrekte Insertion des FocA-Pentamers verhindert wird. Erste Hinweise auf die Oligomerisierung eines Membranproteins, dass in der Tertiärstruktur hohe Ähnlichkeiten zu FocA besitzt, wurden kürzlich veröffentlicht (Neumann *et al.*, 2012). Dabei konnte anhand des Aquaglyceroporins (GlpF) gezeigt werden, dass die Oligomerisierung erst nach der Insertion der Monomere in die Membran erfolgt. Es wird

hierbei postuliert, dass es nach der Insertion der einzelnen Helices zu einer Ausbildung einzelner Domänen durch Helix-Helix-Interaktionen kommt. Diese Domänen führen anschließend zur Ausbildung der Monomere. Zwei Monomere lagern sich dann zu einem Dimer zusammen, welches anschließend zu einem Tetramer verknüpft wird. Da FocA aber eine pentamere Struktur aufweist, bleibt bis zum heutigen Zeitpunkt unverstanden, wie es zur Bildung dieses Pentamers kommt. In den verschiedenen in dieser Arbeit hergestellten Varianten zeigten sich ebenfalls unterschiedliche Oligomer Formen. Wie in Abb. 12 zu erkennen ist, konnte bei allen Varianten, außer FocA (V175A), FocA (D190A) und FocA (F202A), mehrere Banden unterhalb der 440 kDa Bande mit verschiedenen AK nachgewiesen werden. Diese Banden würden aufgrund ihrer Größe auch dem Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer zugeordnet werden. Interessant ist besonders die Variante D190A. Bei dieser Variante wurde Alanin als Austausch-Variante gewählt und es konnten nur das Pentamer bzw. das Pentadekan nachgewiesen werden. Tauschte man allerdings das Aspartat an Position 190 zu einem Lysin, entstand eine doppelt positive Ladung (Lysin an Position 190 und 191) und es konnten wieder eine tetramere und trimere Form nachgewiesen werden. Diese Änderung in der Ladung beeinflusst wahrscheinlich die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Monomeren. Eine weitere Erklärung für das Auftreten verschiedener Oligomer-Formen könnte eine reduzierte Stabilität der FocA-Varianten sein. Durch das Solubilisieren der Membran kommt es zur Anlagerung von Seifenmolekülen, welche mit hydrophoben Resten an die hydrophoben Bereiche der Proteine binden und dabei teilweise die Phospholipide verdrängen (Roth *et al.*, 1989). Somit ist es möglich, dass das Pentamer nicht komplett in die Mizelle integriert werden konnte und in den gereinigten Proteinfractionen unterschiedliche Oligomere nachweisbar waren. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten weitere Untersuchungen erfolgen.

4.2 Die Rolle des N-Terminus in FocA

Nach der Veröffentlichung der Kristallstrukturen zeigten sich erste Hinweise, dass der N-Terminus flexibler ist als andere Regionen von FocA (Tabelle 11). Wang *et al.* war es nicht gelungen das Volllängen-Protein-FocA aus *E. coli* zu kristallisieren. Daher entschieden sie sich den N-Terminus durch ein V8-Protease zu verkürzen. Erst nach diesem Verdau war es möglich Kristalle zu erhalten, welche in einer guten Auflösung betrachtet werden konnten. Auch Waight *et al.* (2010) waren nicht in der Lage eine geordnete Form des N-Terminus des FocA-Proteins aus *V. cholerae* zu kristallisieren. Auffällig war auch, dass es in der hier vorliegenden Arbeit nicht möglich war N-Terminal verkürzte Varianten von FocA herzustellen (Daten nicht gezeigt). Erst Lü *et al.* (2011) gelang es den N-Terminus (verkürzt um 13 AS) von FocA aus *Salmonella typhimurium* in einer Kristallstruktur zu zeigen. Dabei erhielten sie 3 verschiedenen Formen von FocA: eine geschlossene Form, eine offene Form und eine Zwischenform. Die verschiedenen Formen sind in Abb. 35 dargestellt.

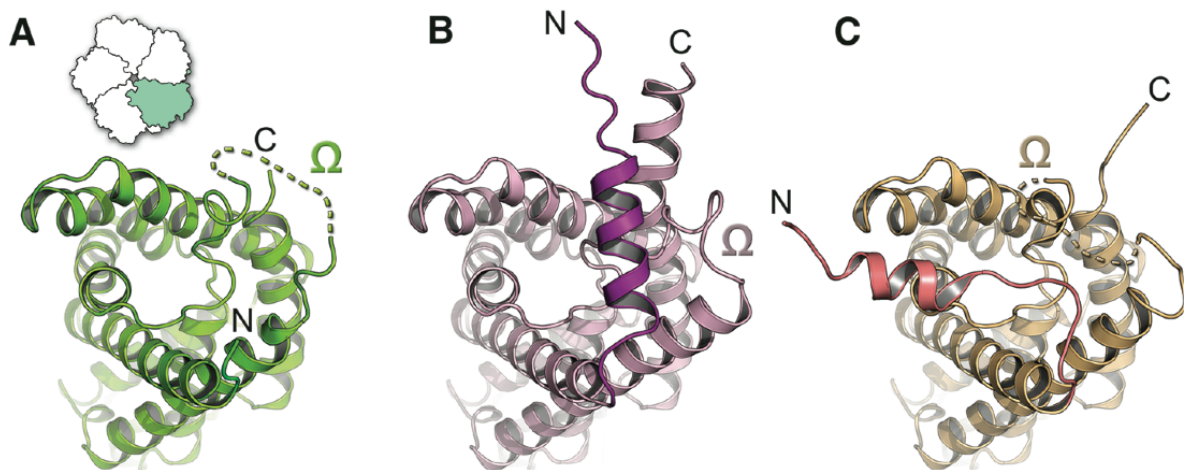


Abb. 35 Darstellung der verschiedenen Formen von FocA aus *S. typhimurium* (nach Lü *et al.* 2011)

A: offene Form, Darstellung der relativen Position des Monomeres im Pentamer; B: Zwischenform; C: geschlossene Form; N: N-Terminus; C: C-Terminus; Ω: Ω-Schleife

Dabei unterschieden sich die Strukturen hauptsächlich in der Lage des N-Terminus sowie der Ω-Schleife. Bei einem pH von 4,0 konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus strukturiert vorliegt, allerdings auch eine hohe Asymmetrie und Flexibilität aufweist. Diese Flexibilität könnte auch auftretende Probleme bei der Kristallisation des N-Terminus erklären. In der offenen Form (Abb. 35 A) liegt der N-Terminus unstrukturiert vor und öffnet somit den Kanal für die Substrate. Eine ähnliche Struktur konnte bei FocA aus *V. cholerae* gezeigt werden, was darauf hin deutet, dass auch diese Struktur eine offene Form darstellt.

Die Zwischenform zeigt den N-Terminus als Helix, welche den Kanal überspannt und verengt, allerdings eine Substrat-Translokation nicht vollständig verhindert (Abb. 35 B). In dieser Form kommt es zu einer Interaktion des N- und C-Terminus mit der Ω -Schleife. In der geschlossenen Form blockiert der N-Terminus den Kanal Eingang, wodurch keine Formiat-Moleküle den Kanal passieren können (Abb. 35 C). Durch die Rotation des N-Terminus verlieren sowohl der C-Terminus als auch die Ω -Schleife ihre strukturiert Konformation. Nur in der Zwischenform liegt die Ω -Schleife strukturiert vor, da wahrscheinlich die Interaktion mit dem N-Terminus eine stabilisierende Funktion erfüllt. In der Kristallstruktur konnten Lü *et al.* sehen, dass in einem Pentamer zwei Kanäle die geschlossene Form zeigen, während die anderen drei Kanäle die offene Form aufweisen. Es wird postuliert, dass der Übergang der einzelnen Formen durch eine Veränderung des pH-Wertes induziert wird. Bei hohen externen pH-Werten erfolgt die Abgabe von Formiat in das Medium durch den passiven Export-Kanal. Sinken die pH-Werte wird Formiat über einen aktiven Formiat/H⁺ Transporter in die Zelle importiert. Schon Rossmann *et al.* gaben 1991 die ersten Hinweise, dass der pH-Gradient über der cytoplasmatischen Membran das Verhältnis von internem und externem Formiat bestimmt. Weiterhin postulierten sie einen Protonen-Symport Mechanismus, welcher Formiat bei saurem pH in die Zellen aufnimmt. Bei alkalischen pH-Werten erfolgt eine Sekretion von Formiat in das Medium. Elektrophysiologische Studien zeigten, dass FocA bei pH 7,0 als spezifischer Kanal fungiert. Bei einem pH-Wert von 5,1 schließt sich der Kanal (Lü *et al.*, 2011). Da alle Versuche in dieser hier vorliegenden Arbeit bei einem externen pH-Wert von 6,85 durchgeführt wurden, wäre davon auszugehen, dass FocA als spezifischer Kanal fungieren würde.

Nach ersten Hinweisen, dass der pH-Wert eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Formiat-Translokation spielt, wurde nun eine Interaktion mit einem weiteren Protein als Regulationsmechanismus in Betracht gezogen. Aufgrund der engen Verknüpfung des Membranproteins FocA und des cytosolischen Proteins PflB im Formiatstoffwechsel wurde zunächst diese Interaktion untersucht. Nachdem schon D. Falke in ihrer Diplomarbeit (2010) zeigen konnte, dass beide Proteine miteinander interagieren, wurde in dieser Arbeit diese Interaktion näher charakterisiert. Durch Colokalisations-Studien konnte gezeigt werden, dass PflB in der Anwesenheit von FocA an der Membran lokalisiert ist. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass PflB auch in der Abwesenheit von FocA in sehr geringen Mengen an der Membran lokalisiert ist. Es ist zu vermuten, dass PflB mit den zweiten, noch unbekanntem, Formiat-Transporter interagiert, somit auch diesen reguliert und deshalb in der Abwesenheit von FocA an der Membran lokalisiert ist. Wäscht man die Membranfraktion allerdings mehrfach mit hohen Salzkonzentrationen (500 mM NaCl) so ist

PfIB nur FocA abhängig an der Membran lokalisiert, was darauf hindeutet, dass die Interaktion zwischen PfIB und FocA stärker ist als zwischen PfIB und dem anderen Formiat-Transporter. *Pull-down* Analysen bestätigten die Colokalisations-Ergebnisse und zeigten eine starke spezifische Interaktion zwischen beiden Proteinen.

Bisher konnten diese nicht-kovalenten Wechselwirkung allerdings nicht genau definiert werden, da bei Protein-Protein-Interaktionen verschiedene Bindungstypen involviert sein können (Ofraim & Rost, 2003). Diese unterscheiden sich aufgrund der Größe, Form sowie der Oberflächen Komplementarität (Fernández & Scheraga, 2003). Dabei wurde für Standard-Interaktionsflächen (Horton & Lewis, 1992) eine Größe von 1200-2000 Å² gezeigt. Kurzlebige oder instabilere Komplexe zeichnen sich durch etwas kleiner (1150-1200 Å²) Interaktionsflächen aus (Conte *et al.*, 1999). Größere Interaktionsflächen zwischen 2000 – 4660 Å² treten bisher nur zwischen Proteasen, eine speziellen Klasse von Inhibitoren, G-Proteine und Komponenten des Signal-Transduktion Systems auf (Horton & Lewis, 1992; Janin & Chothia, 1990). Die Bindung zwischen FocA und PfIB würde wahrscheinlich in der Gruppe der Standard-Interaktionen eingeordnet werden, da durch verschiedene Salzkonzentrationen gezeigt werden konnte, dass es sich hierbei um keine instabile Bindung handelt.

Die Bindungstypen werden in die drei wichtigsten Gruppen unterteilt: elektrostatische Bindungen, Wasserstoffbrücken- und Van-der-Waals Bindungen. Diese Gruppen unterscheiden sich voneinander in der räumlichen Struktur, Bindungsstärke und Spezifität (Cho *et al.*, 2005). Elektrostatische Bindungen treten meist zwischen entgegengesetzt geladenen AS-Resten auf. Durch intermolekulare Salzbrücken, kann diese Bindung stabilisiert werden (Xu *et al.*, 1997). Im Gegensatz zur elektrostatischen Bindung können sich Wasserstoffbrücken zwischen ungeladenen und geladenen AS-Resten ausbilden, wobei sich immer zwei Atome ein Wasserstoffatom teilen (Jones & Thornton, 1996). Auffällig ist, dass 76 % der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen AS-Resten an der Kontaktfläche zu Interaktionspartnern ausgebildet werden (Moreira *et al.*, 2007). Die Wechselwirkungen durch Van-der-Waals Kräfte beruhen auf der Ausbildung von schwachen Bindungen zwischen apolaren AS-Resten. Treten diese allerdings in größerer Dichte in der Kontaktfläche auf, führt dies häufig zur Ausbildung von engen Bindungen. Bei vielen Protein-Protein Interaktionen können sowohl elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, als auch Van-der-Waals Kräfte beteiligt sein. Da bei der Interaktion zwischen FocA und PfIB noch keine Hinweise vorhanden sind um welche Wechselwirkungen es sich handelt, sollten weitere Untersuchungen erfolgen.

Die meist verbreitete Methode zur Untersuchung von Interaktionsflächen ist der Austausch einzelner AS um deren Beteiligung an der Interaktion zu bestimmen. In dieser Arbeit wurden mehrere AS durch andere ersetzt. Auch mit diesen Varianten wurden *pull-down* Analysen durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass alle Varianten mit PflB interagieren. Jedoch konnten keine Unterschiede in der Bandenintensität gesehen werden, so dass keine Aussage über den Einfluss eines AS-Austausches auf die Interaktion gezeigt werden konnte.

Durch den Austausch einzelner AS zu einem Alanin konnten von mehreren Arbeitsgruppen sogenannte *hot spots* vorhergesagt werden (Bogan & Thorn, 1998; Hu *et al.*, 2000). Bei einem *hot spot* handelt es sich um einen AS-Rest, der wenn er zu einem Alanin mutiert wird, zu einem Absinken der Bindekonstante führt. Anstatt von Alanin könnte auch eine Austausch zu Glycin erfolgen, welcher allerdings auch eine Flexibilität des Proteinrückgrates induziert und daher eher selten durchgeführt wird (Morrison & Weiss, 2001). Anhand der generellen Eigenschaften eines AS-Restes (Hydrophobizität, Form und Ladung) kann bis jetzt noch keine Aussage getroffen werden, welche Atome einen *hot spot* bilden können (Conte *et al.*, 1999; Jones & Thornton, 1996). Es wird allerdings immer öfter gezeigt, dass polare Reste an der Oberfläche von Proteinen häufig *hot spots* bilden (Ma *et al.*, 2003). Bogan und Thorn (1998) fanden heraus, dass in *hot spot* Regionen im Allgemeinen vorwiegend die AS mit hydrophoben Seitenketten, z. B. Tryptophan (21 %), Tyrosin (13,3 %) und Arginin (12,3 %) angereichert sind. Durch diese Seitenketten wären Wechselwirkungen mit anderen Proteinen leichter möglich. Regionen mit einem hohen Anteil an AS mit hydrophoben Seitenketten konnten in FocA nicht identifiziert werden (Abb. 37). Leucin, Serin, Threonin und Valin sind fast nie in *hot spots* zu finden. In FocA konnten keine Regionen identifiziert werden, welche diese AS gehäuft enthielten.

Aufgrund einer Veröffentlichung im Jahr 2001 konnte gezeigt werden, dass durchschnittlich 9,5 % der AS-Reste an der Oberfläche *hot spots* bilden können (Bogan & Thorn, 1998; Thorn & Bogan, 2001). *Hot spots* überlappen häufig mit hoch konservierten AS-Resten im Protein (Keskin *et al.*, 2005; Li *et al.*, 1998) und die Anzahl dieser scheint mit der Größe des zu analysierenden Systems zu korrelieren (Hu *et al.*, 2000). Zudem zeigte sich, dass AS-Reste an der Interaktionsfläche meist einem gemeinsamen evolutionären Ursprung besitzen, d. h. stark konserviert sind (del Sol *et al.*, 2003; Goh & Cohen, 2002). Diese Tatsache würde wieder für die wichtige Rolle der AS D190 und K191 im FocA Protein sprechen. Da wie schon gezeigt wurde beide AS je nach Vorhandensein von PflB konserviert vorliegen, würde dies die These von del Sol *et al.* (2003) und Goh & Cohen (2002) unterstützen.

Wie die steigende Anzahl an kristallisierten Protein-Komplexen zeigt, sind immer mehr Protein-Protein-Interaktionen strukturabhängig (Najmanovich *et al.*, 2000). Einige

Interaktion sind auch abhängig von der Funktion und somit in der Lage verschiedene Partner zu binden (Barnett *et al.*, 2000; DeLano *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2001). Leider war es bisher nicht möglich Co-Kristalle von FocA und PflB zu analysieren. Diese Daten würden eindeutige Hinweise auf eine mögliche Interaktionsfläche geben.

In dieser Arbeit wurden Interaktionsstudien zwischen dem Membranprotein-FocA und einigen cytosolischen Proteinen durchgeführt. Dabei konnte durch *pull-down* Analysen gezeigt werden, dass die Pyruvat-Formiat-Lyase in ihrer inaktiven Form mit FocA interagieren kann. Diese Bindung scheint spezifisch und relativ stark zu sein, da eine Interaktion auch in der Anwesenheit von 500 mM NaCl nachgewiesen werden konnte (Falke, 2010). Bei der Interaktion zeigten sich allerdings schon in den *pull-down* Analysen Unterschiede. Wurde das N-terminal getaggte FocA verwendet zeigte sich eine schwächere Interaktion als mit dem C-terminal getaggtten Protein. Daher wurde zunächst vermutet, dass der N-Terminus des FocA-Proteins eine wichtige Rolle in der Interaktion einnimmt. Wie schon in den Kristallstrukturen von FocA aus verschiedenen Organismen (Lü *et al.*, 2011; Waight *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009) gezeigt werden konnte, scheint der N-Terminus sehr flexibel zu sein und seine Struktur pH-abhängig zu verändern. Daher ist es vorstellbar, dass ein zusätzlicher *tag* am N-Terminus eine Interaktion verhindern bzw. schwächen könnte. Daher wurde die Interaktion auch in *in vivo*-Versuchen untersucht. Die Ergebnisse des *bacterial two hybrid* (BACTH) Systems deuten ebenfalls darauf hin, dass der N-Terminus von FocA eine entscheidende Rolle spielt. Eine deutliche β -Galaktosidase-Aktivität war nur messbar, wenn das „Fänger-Protein“ C-Terminal an FocA fusioniert war. *Cross-linking* Daten, welche von Michael Zorn (AG Sinz, Pharmazie, Universität Halle-Wittenberg) erhoben wurden, lassen ebenfalls darauf deuten, dass der N-Terminus an der Interaktion mit PflB beteiligt ist. Aus den Daten des BACTH-Systems ist ersichtlich, dass zwei verschiedene PflB Fragmente mit FocA interagieren. Diese Fragmente haben als einzige gemeinsame AS die AS424. Es wäre also denkbar, dass sich im Bereich um M424 mögliche Interaktionsflächen befinden. Die *cross-linking* Daten gaben weitere Hinweise, dass die Region um die Lysine K441 - K473 im PflB-Protein in die Interaktion involviert zu sein scheinen, da diese durch *cross-linking* mit AS von FocA verbunden waren. Analysiert man jedoch die AS-Zusammensetzung dieser Region, widersprechen die *cross-linking* Daten, der postulierten AS-Zusammensetzung in *hot spots* (geringer Anteil an Tyrosin, Arginin und Tryptophan). Für die Interaktionsflächen von PflB lassen sich aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Daten nur wenige Rückschlüsse ziehen. Zwar zeigte sich in *pull-down* Analysen mit dem verkürzten PflB (1-733) ebenfalls eine Interaktion, woraufhin angenommen werden kann, dass der C-Terminus von PflB keine Rolle in der Interaktion spielt. Dennoch müssten diese ersten Daten durch weitere Experimente bestätigt werden,

um ein endgültiges Modell aufstellen zu können. Ein weiterer Hinweis auf die Interaktion des N-Terminus von FocA konnte durch Analysen des FocA Proteins aus *Thermococcus gammertolerans* gezeigt werden (persönliche Mitteilung A. K. Richter, Biologie, Universität Halle-Wittenberg). Dabei wurde festgestellt, dass FocA aus diesem Archeon nicht mit PflB aus *E. coli* interagiert. In Sequenz-Vergleichen der FocA Proteine zeigt sich, dass der N-Terminus beider Proteine nur sehr wenige Sequenz-Homologien aufweist (Abb. 37). Weiterhin konnte auch nicht 100%ig geklärt werden, ob das FocA Protein aus *T. gammatolerans* dieselbe Funktion im Formiat-Stoffwechsel einnimmt wie FocA aus *E. coli*. In der Veröffentlichung konnte lediglich gezeigt werden, dass *T. gammertolerans* in der Lage ist Formiat zu oxidieren und Formiat zu translozieren (Kim *et al.*, 2010). Ob diese Translokation ebenfalls über eine Interaktion mit einem cytosolischen Protein erfolgt ist nicht bestätigt. Auch bei vielen anderen Membranproteinen konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus nicht nur für die Funktion wichtig ist, sondern auch Bindungen mit anderen Interaktionspartnern eingeht. So wurde es zum Beispiel für die *mammalian transient receptor potential (canonical)* (TRPC) Kanäle gezeigt, dass die N-terminale Domäne der IP3-Rezeptoren mit TRPC3 interagiert (Kiselyov *et al.*, 1998; 1999). Es konnte zudem gezeigt werden, dass der IP3-Rezeptor mit der C-terminalen bzw. N-terminalen Domäne der TRPCs interagiert (Birnbaumer *et al.*, 2000; Boulay *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Somit zeigt sich auch, dass der N-Terminus flexibel auf verschiedene Bedingungen reagieren kann.

4.3 Interaktion von FocA mit anderen cytosolischen Proteinen

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, interagiert das Membranprotein FocA auch mit dem löslichen Protein TdcE. TdcE ist eine 2-Ketobutyrat-Formiat-Lyase, welche ebenfalls in der Lage ist Pyruvat zu spalten. Durch die Herstellung einer *pflB*-Mutante konnte gezeigt werden, dass TdcE die Funktion von PflB übernehmen kann und ebenfalls Formiat produziert (Sawers *et al.*, 1998). TdcE kann wie PflB von dem Enzym PflA aktiviert werden. In der Primärstruktur ist eine 78%ige Identität und 91%ige Ähnlichkeit zur Primärstruktur von PflB zu sehen. Zudem weisen beide Proteine eine nahezu identische Molekularmasse auf. In Anbetracht der hohen Identität und ähnlicher Molekularmasse ließe sich auch eine Tertiärstruktur ableiten, so dass ähnliche Interaktionsflächen wie bei FocA und PflB entstehen könnten. Bei Interaktionsstudien konnte bestätigt werden, dass das gereinigte TdcE mit FocA interagiert. Betrachtet man konservierte Bereiche zwischen beiden Proteinen ist auffällig, dass beide eine Gleichverteilung von Tryptophan, Tyrosin und Arginin besitzen und somit gleiche *hot spots* bilden könnten. Diese hohe Identität sowie die Tatsache, dass beide Proteine dasselbe Substrat binden, unterstützen die in dieser Arbeit gezeigten Daten.

Zudem wurden Interaktionsstudien zwischen FocA und PflD bzw. PflF durchgeführt. Diese zeigten keine Interaktion zwischen den gereinigten Proteinen. Für das Genprodukt von *pflD* wurde aufgrund seiner Lage im Genom eine Funktion im Zucker-Stoffwechsel postuliert, da das Gen zusammen mit Genen des Phospho-Transferase-Systems lokalisiert ist. Die Vermutung konnte allerdings bisher nicht bestätigt werden (Taubert, 2008). PflD besitzt zu PflB eine Identität von 25 % (Abb. 39). Für PflF ist es schwierig eine solche Funktion aufgrund der Lage des Gens im Genom hervorzusagen. In näherer Umgebung des Gens befinden sich Gene, die für eine Untereinheit der Aldolase (*fsaA*) sowie für eine Zucker-Phosphatase (*ybiV*) codieren. In der Nachbarschaft von *pflF* sind Gene lokalisiert, welche für Komponenten des Molybdopterin-Biosynthese-Weges codieren. Durch Analysen der Synthesebedingungen, sollten erste Hinweise auf eine Funktion gegeben werden, welche allerdings nicht erfolgreich waren (Lehneck, 2010). PflF besitzt eine 28%ige Identität zu PflB (Abb. 39). Da für beide Enzyme (PflD und PflF) keine Funktion im Formiat-Stoffwechsel nachgewiesen werden konnte, ist es nicht auffällig, dass beide Proteine keine Interaktion mit FocA zeigen.

4.4 Modell zur Regulation der Formiattranslokation in *E. coli*

Um nun ein mögliches Modell für die Interaktion zwischen FocA und PflB aufstellen zu können, wurden zunächst die Strukturen näher betrachtet. Wie bereits dargestellt (Abb. 35), ist der N-Terminus von FocA sehr flexibel und kann verschiedenen Positionen einnehmen. In mehreren Experimenten konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von FocA an der Interaktion mit PflB beteiligt ist. Da das Pentamer von FocA die funktionelle Einheit des Proteins zu bilden scheint, sollte zunächst betrachtet werden, ob die Formiattranslokation über die Monomer-Pore oder die zentrale Pore erfolgt. Da schon Wang *et al.* (2009) zeigen konnten, dass die AS, die der monomeren Pore zu gerichtet sind, Engstellen bilden können und die zentrale Pore in der Kristallisationsansätzen immer mit Deterenz (wahrscheinlich *in vivo* mit Lipiden gefüllt) gefüllt war, schlussfolgerten sie, dass die Translokation über die Monomer-Pore erfolgt. Auch Waight *et al.* (2010), sowie Lü *et al.* (2011) postulierten eine Translokation über die monomere Pore. Aufgrund dieser Aussagen sollte für ein mögliches Modell zunächst diese Pore in Betracht gezogen werden. Auch bei PflB konnte nachgewiesen werden, dass es als Dimer vorliegt und somit sollte auch dieses in das Modell mit einbezogen werden (Becker *et al.*, 1999). Die Größe der Proteine mit den berechneten Molekularmassen für FocA als Pentamer (ca. 150 kDa) und PflB als Dimer (ca. 170 kDa) würde mehrere Interaktionsflächen ermöglichen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von FocA und die AS 1-733 von PflB an der Interaktion beteiligt zu sein scheint. Daher wurden diese in das Modell mit einbezogen. Ebenfalls wurde im Modell einer möglichen Regulation der Translokation die Interaktion der inaktiven Form vom PflB, sowie eine Aktivierung von PflB durch PflA an der Membran berücksichtigt. Das derzeitige Modell ist in Abb. 36 dargestellt.

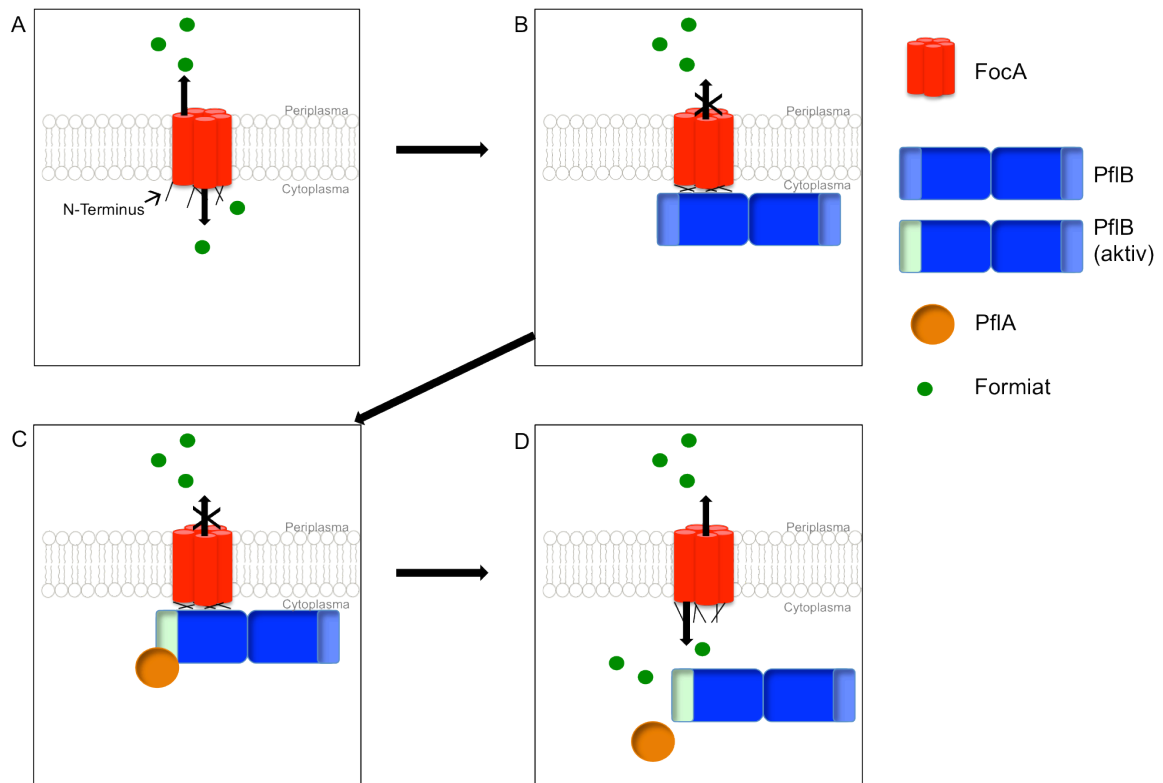


Abb. 36 Schematische Darstellung der Interaktion von FocA und PflB, sowie der Regulation durch PflB

A: Das membranständige FocA-Protein ist in der Lage Formiat zu importieren, als auch zu exportieren. Der N-Terminus ist in der offenen Konformation. B: Bindet nun die inaktive Form von PflB an FocA, befinden sich die N-Termini in der geschlossenen Konformation und Formiat kann nicht transloziert werden. Der hellblaue Teil von PflB stellt hierbei die AS 733-760 dar, ein Bereich der wahrscheinlich nicht mit FocA interagiert und in dem das Glycyl-Radikal gebildet wird. C: Durch die Bindung von PflA an PflB erfolgt die Aktivierung von PflB. D: Das aktivierte PflB löst sich von der Membran. Intern produziertes Formiat kann exportiert und externes Formiat kann importiert werden.

In der schematischen Darstellung wird eine Interaktion der inaktiven Form von PflB mit FocA gezeigt, welche durch mehrere Experimente nachgewiesen wurde. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass die aktivierte Form von PflB ebenfalls mit FocA interagiert. Außerdem sollte nicht vergessen werden, dass es sich bei PflB um ein Homodimer handelt und nur jeweils ein Monomer von PflB aktiviert wird (*half site activation*) (Wagner *et al.*, 1992). Es kann zum heutigen Zeitpunkt keine Aussage darüber getroffen werden, ob beide Monomere von PflB mit FocA interagieren oder ob jeweils nur ein Monomer an FocA bindet. Die Änderung der Transportrichtung wäre durch eine mögliche Konformationsänderung beider Interaktionspartner zu erklären. Dies konnte auch schon für Protease-Inhibitor-Komplexe gezeigt werden, wobei zwei Proteine eine Kontaktfläche von 2000-4000 Å² bilden (Conte *et al.*, 1999).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass anhand dieses Modells die Aufnahme von Formiat durch die Interaktion von PflB mit FocA gehemmt wird. Wird allerdings PflB durch PflA aktiviert und ist somit in der Lage Formiat zu produzieren, dissoziiert der Komplex von der Membran und Formiat kann sowohl aufgenommen, als auch abgegeben werden. Die Entscheidung wann Formiat importiert und wann exportiert wird, liegt wahrscheinlich am vorherrschenden pH-Wert in der Zelle und müsste durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

- 1) In dieser Arbeit konnten verschiedene Varianten von FocA überproduziert und gereinigt werden. Es zeigten sich hierbei keine wesentlichen Unterschiede in der Sekundär-Struktur, jedoch konnten unterschiedliche Quartär-Strukturen mittels *Blue native* Page gezeigt werden. Alle FocA-Varianten konnten mit 3 verschiedenen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen werden.
- 2) Durch indirekte Messungen des internen Formiat-Spiegels konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren K26, L79, D190, K191, H209 und N213 eine entscheidende Funktion in der Translokation von Formiat haben. Diese Ergebnisse unterstützen teilweise die bereits von anderen Gruppen veröffentlichten Mechanismen zur Formiat-Translokation.
- 3) Die Glycyl-Radikal Enzyme PflB, PflD und PflF konnten erfolgreich überproduziert und gereinigt werden. Alle gereinigten Proteine konnten für Interaktionsstudien mit FocA eingesetzt werden.
- 4) Mittels Co-Lokalisationsstudien konnte eine FocA-abhängige Lokalisation von PflB (Pyruvat-Formiat-Lyase) an der Cytoplasmamembran gezeigt werden. Je mehr FocA in der Cytoplasmamembran eingebaut war, desto mehr PflB konnte an der Cytoplasmamembran nachgewiesen werden. Durch *pull-down* Analysen konnte gezeigt werden, dass weder PflF noch PflD mit FocA interagieren.
- 5) Mittels *Far Western* Analysen konnte eine Interaktion zwischen dem gereinigten FocA-Protein und dem inaktivem PflB-Protein gezeigt werden. Dabei konnte die C-terminal lokalisierte Glycyl-Radikal-Domäne des PflB als alleinige Interaktionsfläche ausgeschlossen werden.
- 6) Durch *pull-down* Analysen konnte die Interaktion zwischen FocA und PflB bestätigt werden. Dabei interagierte sowohl das native PflB als auch PflB mit einem His tag mit FocA. Für das FocA-Protein konnte gezeigt werden, dass sowohl eine C-terminal-, also auch die N-terminal getaggte Version mit PflB interagiert.
- 7) Durch *in vivo* Untersuchungen wurde gezeigt, dass der N-Terminus von FocA für die Interaktion mit PflB wichtig ist. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass wahrscheinlich eine größere Oberfläche von PflB an der Interaktion mit FocA beteiligt ist.

6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erste Hinweise auf einen möglichen Mechanismus der Formiat-Translokation in *E. coli* erlangt werden. Zudem konnte mit Hilfe verschiedener Interaktionsstudien ein erstes Modell erstellt werden. Um diese zu verifizieren sind allerdings weiterführende Untersuchungen nötig:

- 1) Um genauere Aussagen über den Einfluss einzelner Aminosäuren im FocA-Protein treffen zu können, sollten alle FocA Varianten als Alanin-Austausch Varianten überproduziert und gereinigt werden. Alle Mutationen die einen starken Effekt auf den Formiat Transport haben, sollten ebenfalls an dem Plasmid pASK-IBA3focA erzeugt werden, um einen möglichen Einfluss des *Strep-tags* auf die Aktivität des FocA-Proteins auszuschließen.
- 2) Durch Doppelmutationen im *focA* Gen sollten die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen zur Translokation von Formiat über FocA unterstützt werden. Dadurch könnten eventuell starke Unterschiede in der *in vivo* Funktion von FocA gezeigt werden.
- 3) Durch die Rekonstitution von FocA in Liposomen sollte der Einfluss einzelner Aminosäure-Austausche auf die *in vitro* Funktion des Kanal-Proteins FocA gezeigt werden.
- 4) Andere Methoden zur Untersuchung der Interaktion zwischen zwei Proteinen sollten durchgeführt werden, um die Interaktionsflächen zwischen FocA und PflB näher zu charakterisieren (z.B. *cross-linking* Experimente, *phage-display* Analysen, Co-Kristallisation). Dabei sollten auch am PflB-Protein gezielte Aminosäure-Austausche vorgenommen werden.
- 5) Die bereits erzeugten FocA-Varianten sollten in Interaktionsstudien mit PflB eingesetzt werden, um eventuelle Zusammenhänge zwischen den *in vivo* Ergebnissen und den bisherigen Interaktionsstudien zu zeigen.
- 6) Durch die Identifizierung des weiteren Formiat Transporters, sollte die Regulation der Formiat-Translokation näher untersucht werden.
- 7) Um den kompletten Mechanismus der Formiat-Translokation besser zu verstehen sollte andere mögliche Interaktionspartner von FocA identifiziert und untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

- Barnett, P., Bottger, G., Klein, A. T., Tabak, H. F. & Distel, B. (2000).** The peroxisomal membrane protein Pex13p shows a novel mode of SH3 interaction. *EMBO J* **19**, 6382–6391.
- Becker, A., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W., Knappe, J., Schultz, S. & Volker Wagner, A. F. (1999).** Structure and mechanism of the glycyl radical enzyme pyruvate formate-lyase. *Nat Struct Biol* **6**, 969–975.
- Becker, A. & Kabsch, W. (2002).** X-ray structure of pyruvate formate-lyase in complex with pyruvate and CoA. How the enzyme uses the Cys-418 thiyl radical for pyruvate cleavage. *J Biol Chem* **277**, 40036–40042.
- Berg, B. L., Li, J., Heider, J. & Stewart, V. (1991).** Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. I. Nucleotide sequence of the *fdnGHI* operon and evidence that *opal* (UGA) encodes selenocysteine. *J Biol Chem* **266**, 22380–22385.
- Bertram, S. & Gassen, H. G. (1991).** Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Beyer, L. (2009).** Untersuchungen zum Formiat-Stoffwechsel in *Escherichia coli*. Diplomarbeit.
- Birnbaumer, L., Boulay, G., Brown, D., Jiang, M., Dietrich, A., Mikoshiba, K., Zhu, X. & Qin, N. (2000).** Mechanism of capacitative Ca^{2+} entry (CCE): interaction between IP3 receptor and TRP links the internal calcium storage compartment to plasma membrane CCE channels. *Recent Prog Horm Res* **55**, 127–61– discussion 161–2.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1513–1523.
- Bogan, A. A. & Thorn, K. S. (1998).** Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* **280**, 1–9.
- Boulay, G., Brown, D. M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M. X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K. & Birnbaumer, L. (1999).** Modulation of Ca^{2+} entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca^{2+} entry. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 14955–14960.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Casadaban, M. J. & Cohen, S. N. (1979).** Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4530–4533.

- Cho, S., Swaminathan, C. P., Yang, J., Kerzic, M. C., Guan, R., Kieke, M. C., Kranz, D. M., Mariuzza, R. A. & Sundberg, E. J. (2005).** Structural basis of affinity maturation and intramolecular cooperativity in a protein-protein interaction. *Structure* **13**, 1775–1787.
- Conte, Lo, L., Chothia, C. & Janin, J. (1999).** The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* **285**, 2177–2198.
- Coutts, G., Thomas, G., Blakey, D. & Merrick, M. (2002).** Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J* **21**, 536–545.
- Czyzewski, B. K. & Wang, D.-N. (2012).** Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature* **483**, 494–497.
- del Sol, A., del Sol Mesa, A., Pazos, F. & Valencia, A. (2003).** Automatic methods for predicting functionally important residues. *J Mol Biol* **326**, 1289–1302.
- DeLano, W. L., Ultsch, M. H., de Vos, A. M. & Wells, J. A. (2000).** Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science* **287**, 1279–1283.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988).** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127–6145.
- Drapal, N. & Sawers, G. (1995).** Promoter 7 of the *Escherichia coli pfl* operon is a major determinant in the anaerobic regulation of expression by ArcA. *J Bacteriol* **177**, 5338–5341.
- Enoch, H. G. & Lester, R. L. (1975).** The purification and properties of formate dehydrogenase and nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **250**, 6693–6705.
- Falke, D. (2010).** Untersuchungen zu Protein-Protein Wechselwirkungen von FocA in *Escherichia coli*. Diplomarbeit.
- Falke, D., Schulz, K., Doberenz, C., Beyer, L., Lillie, H., Thiemer, B. & Sawers, R. G. (2010).** Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of *Escherichia coli* : a paradigm for the formate-nitrite transporter family of integral membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* **303**, 69–75.
- Feng, Z., Hou, T. & Li, Y. (2012).** Concerted Movement in pH-Dependent Gating of FocA from Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Inf Model*.
- Fernández, A. & Scheraga, H. A. (2003).** Insufficiently dehydrated hydrogen bonds as determinants of protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 113–118.
- Gascoigne, N. R. J. & Zal, T. (2004).** Molecular interactions at the T cell-antigen-presenting cell interface. *Curr Opin Immunol* **16**, 114–119.
- Goh, C.-S. & Cohen, F. E. (2002).** Co-evolutionary analysis reveals insights into protein-protein interactions. *J Mol Biol* **324**, 177–192.
- Goss, T. J., Schweizer, H. P. & Datta, P. (1988).** Molecular characterization of the *tdc* operon of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **170**, 5352–5359.

- Griffith, K. L. & Wolf, R. E. (2002).** Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 397–402.
- Haddock, B. A. & Jones, C. W. (1977).** Bacterial respiration. *Bacteriol Rev* **41**, 47–99.
- Harris, B. Z., Hillier, B. J. & Lim, W. A. (2001).** Energetic determinants of internal motif recognition by PDZ domains. *Biochemistry* **40**, 5921–5930.
- Hesslinger, C., Fairhurst, S. A. & Sawers, G. (1998).** Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. *Mol Microbiol* **27**, 477–492.
- Horton, N. & Lewis, M. (1992).** Calculation of the free energy of association for protein complexes. *Protein Sci* **1**, 169–181.
- Hu, Z., Ma, B., Wolfson, H. & Nussinov, R. (2000).** Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. *Proteins* **39**, 331–342.
- Hunger, D. (2012).** Identifizierung von Aminosäuren der Omega-Schleife von FocA aus *Escherichia coli*, die am Formiattransport beteiligt sind. Diplomarbeit.
- Janin, J. & Chothia, C. (1990).** The structure of protein-protein recognition sites. *J Biol Chem* **265**, 16027–16030.
- Jones, S. & Thornton, J. M. (1996).** Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13–20.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. (1998).** A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5752–5756.
- Karimova, G., Ullmann, A. & Ladant, D. (2000).** A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Meth Enzymol* **328**, 59–73.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. (2005).** How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* **1751**, 119–139.
- Keskin, O., Ma, B. & Nussinov, R. (2005).** Hot regions in protein-protein interactions: the organization and contribution of structurally conserved hot spot residues. *J Mol Biol* **345**, 1281–1294.
- Kessler, D., Herth, W. & Knappe, J. (1992).** Ultrastructure and pyruvate formate-lyase radical quenching property of the multienzymic AdhE protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 18073–18079.
- Kim, Y. J., Lee, H. S., Kim, E. S., Bae, S. S., Lim, J. K., Matsumi, R., Lebedinsky, A. V., Sokolova, T. G., Kozhevnikova, D. A., & other authors. (2010).** Formate-driven growth coupled with H₂ production. *Nature* **467**, 352–355.
- Kiselyov, K., Mignery, G. A., Zhu, M. X. & Muallem, S. (1999).** The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* **4**, 423–429.
- Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L. & Muallem, S. (1998).** Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* **396**, 478–482.

- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H. & Mori, H. (2005).** Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* **12**, 291–299.
- Knappe, J. & Sawers, G. (1990).** A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**, 383–398.
- Kotrba, P., Inui, M. & Yukawa, H. (2001).** Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J Biosci Bioeng* **92**, 502–517.
- Ladant, D. & Ullmann, A. (1999).** *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* **7**, 172–176.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lehneck, R. (2010).** Charakterisierung eines neuartigen Glycyl-Radikal-Enzyms in *E. coli*.
- Li, W., Hamill, S. J., Hemmings, A. M., Moore, G. R., James, R. & Kleanthous, C. (1998).** Dual recognition and the role of specificity-determining residues in colicin E9 DNase-immunity protein interactions. *Biochemistry* **37**, 11771–11779.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275.
- Lü, W., Du, J., Wacker, T., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S. L. A. & Einsle, O. (2011).** pH-Dependent Gating in a FocA Formate Channel. *Science* **332**, 352–354.
- Ma, B., Elkayam, T., Wolfson, H. & Nussinov, R. (2003).** Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 5772–5777.
- Macy, J., Kulla, H. & Gottschalk, G. (1976).** H₂-dependent anaerobic growth of *Escherichia coli* on L-malate: succinate formation. *J Bacteriol* **125**, 423–428.
- Marusyk, R. & Sergeant, A. (1980).** A simple method for dialysis of small-volume samples. *Anal Biochem* **105**, 403–404.
- Moreira, I. S., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. (2007).** Hot spots—a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins* **68**, 803–812.
- Morrison, K. L. & Weiss, G. A. (2001).** Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 302–307.
- Najmanovich, R., Kuttner, J., Sobolev, V. & Edelman, M. (2000).** Side-chain flexibility in proteins upon ligand binding. *Proteins* **39**, 261–268.
- Neumann, J., Klein, N. & Schneider, D. (2012, June 18).** *Biospektrum*.
- Nnyepi, M. R., Peng, Y. & Broderick, J. B. (2007).** Inactivation of *E. coli* pyruvate formate-lyase: role of AdhE and small molecules. *Arch Biochem Biophys* **459**, 1–9.
- Ofran, Y. & Rost, B. (2003).** Analysing six types of protein-protein interfaces. *J Mol Biol* **325**, 377–387.

- Parast, C. V., Wong, K. K., Kozarich, J. W., Peisach, J. & Magliozzo, R. S. (1995).** Electron paramagnetic resonance evidence for a cysteine-based radical in pyruvate formate-lyase inactivated with mercaptopyruvate. *Biochemistry* **34**, 5712–5717.
- Pawson, T. & Nash, P. (2000).** Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev* **14**, 1027–1047.
- Peakman, T., Crouzet, J., Mayaux, J. F., Busby, S., Mohan, S., Harborne, N., Wootton, J., Nicolson, R. & Cole, J. (1990).** Nucleotide sequence, organisation and structural analysis of the products of genes in the *nirB-cysG* region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Eur J Biochem* **191**, 315–323.
- Rossmann, R., Sawers, G. & Böck, A. (1991).** Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Mol Microbiol* **5**, 2807–2814.
- Roth, M., Lewit-Bentley, A., Michel, H., Deisenhofer, J., Huber, R. & Oesterheldt. (1989).** Detergent structure in crystals of a bacterial photosynthetic reaction centre. *Nature* 659–662.
- Rödel, W., Plaga, W., Frank, R. & Knappe, J. (1988).** Primary structures of *Escherichia coli* pyruvate formate-lyase and pyruvate-formate-lyase-activating enzyme deduced from the DNA nucleotide sequences. *Eur J Biochem* **177**, 153–158.
- Russell, J. (1992).** Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of applied microbiology*.
- Saier, M. H., Eng, B. H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D. A., Hutchinson, W. J., Jack, D. L., Lai, E. C., Liu, H. J., & other authors. (1999).** Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta* **1422**, 1–56.
- Sambrook, J., Fritsche, E. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. (N. Molan, Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1992).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*.
- Sauter, M. & Sawers, R. G. (1990).** Transcriptional analysis of the gene encoding pyruvate formate-lyase-activating enzyme of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**, 355–363.
- Sawers, G. (1994).** The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**, 57–88.
- Sawers, G. & Böck, A. (1988).** Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **170**, 5330–5336.
- Sawers, G. & Böck, A. (1989).** Novel transcriptional control of the pyruvate formate-lyase gene: upstream regulatory sequences and multiple promoters regulate anaerobic expression. *J Bacteriol* **171**, 2485–2498.
- Sawers, G., Heider, J., Zehelein, E. & Böck, A. (1991).** Expression and operon structure of the *sel* genes of *Escherichia coli* and identification of a third selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *J Bacteriol* **173**, 4983–4993.

- Sawers, G., Hesslinger, C., Muller, N. & Kaiser, M. (1998).** The glycyl radical enzyme TdcE can replace pyruvate formate-lyase in glucose fermentation. *J Bacteriol* **180**, 3509–3516.
- Sawers, G. & Suppmann, B. (1992).** Anaerobic induction of pyruvate formate-lyase gene expression is mediated by the ArcA and FNR proteins. *J Bacteriol* **174**, 3474–3478.
- Sawers, G. & Watson, G. (1998).** A glycyl radical solution: oxygen-dependent interconversion of pyruvate formate-lyase. *Mol Microbiol* **29**, 945–954.
- Sawers, R. G. (2005).** Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli* **33**, 42–46. Portland Press Ltd.
- Sawers, R. G. (2006).** Differential turnover of the multiple processed transcripts of the *Escherichia coli* *focA-pflB* operon. *Microbiology (Reading, Engl)* **152**, 2197–2205.
- Schägger, H. & Jagow, von, G. (1991).** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**, 223–231.
- Strøm, A. R., Olafsen, J. A. & Larsen, H. (1979).** Trimethylamine oxide: a terminal electron acceptor in anaerobic respiration of bacteria. *J Gen Microbiol* **112**, 315–320.
- Suppmann, B. (1993).** Genetische Untersuchungen zum Formiat-Transport in *Escherichia coli*. Dissertation.
- Suppmann, B. & Sawers, G. (1994).** Isolation and characterization of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the *pfl* operon, as a putative formate transporter. *Mol Microbiol* **11**, 965–982.
- Tang, J., Lin, Y., Zhang, Z., Tikunova, S., Birnbaumer, L. & Zhu, M. X. (2001).** Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem* **276**, 21303–21310.
- Taubert, J. (2008).** Biochemische Charakterisierung eines neuartigen Glycyl-Radikal-Enzyms aus *E. coli*.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Thorn, K. S. & Bogan, A. A. (2001).** ASEdb: a database of alanine mutations and their effects on the free energy of binding in protein interactions. *Bioinformatics* **17**, 284–285.
- van der Plas, J., Hellingwerf, K. J., Seijen, H. G., Guest, J. R., Weiner, J. H. & Konings, W. N. (1983).** Identification and localization of enzymes of the fumarate reductase and nitrate respiration systems of *Escherichia coli* by crossed immunoelectrophoresis. *J Bacteriol* **153**, 1027–1037.
- Wagner, A. F., Frey, M., Neugebauer, F. A., Schäfer, W. & Knappe, J. (1992).** The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 996–1000.
- Waight, A. B., Love, J. & Wang, D.-N. (2010).** Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 31–37.

- Wang, Y., Huang, Y., Wang, J., Cheng, C., Huang, W., Lu, P., Xu, Y.-N., Wang, P., Yan, N. & Shi, Y. (2009).** Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature* **462**, 467–472.
- Wanner, B. L. & Wilmes-Riesenberg, M. R. (1992).** Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 2124–2130.
- Warren, A. J. (2002).** Eukaryotic transcription factors. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 107–114.
- Weber, K. & Osborn, M. (1969).** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**, 4406–4412.
- White, W. B. & Ferry, J. G. (1992).** Identification of formate dehydrogenase-specific mRNA species and nucleotide sequence of the *fdhC* gene of *Methanobacterium formicicum*. *J Bacteriol* **174**, 4997–5004.
- Wimpenny, J. W. & Cole, J. A. (1967).** The regulation of metabolism in facultative bacteria. 3. The effect of nitrate. *Biochim Biophys Acta* **148**, 233–242.
- Xu, D., Tsai, C. J. & Nussinov, R. (1997).** Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. *Protein Eng* **10**, 999–1012.
- Zhang, Z., Tang, J., Tikunova, S., Johnson, J. D., Chen, Z., Qin, N., Dietrich, A., Stefani, E., Birnbaumer, L. & Zhu, M. X. (2001).** Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3168–3173.
- Zoller, M. J. & Smith, M. (1982).** Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Res* **10**, 6487–6500.

8 Anhang

Tabelle 12 Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Charakteristik	Tm (°C)
Primer für Mutagenese			
K26A-focA for	GAGGCGGGTGTCTATGCGGCAACGAAACATCC	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch K26A	78
K26A-focA rev	GGATGTTTCGTTGCCGCATAGACACCCGCCTC	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch K26A	78
C74S-focA for	ACTGGTTGGCGGCATTAGCTTCTCTCTGGG	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch C74S	79
C74S-focA rev	CCCAGAGAGAAGCTAATGCCGCCAACCAGT	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch C74S	79
L79A-focA for	CATTGCTTCTCTCTGGGGGCGATTCTTTGTGTTGTCTG	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch L79A	79
L79A-focA rev	GCAGACAACACAAAGAATCGCCCCAGAGAGAAGCAAATG	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch L79A	79
C82S-focA for	CTGATTCTTCTGTGTTGTCTCGGGAGCC	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch C82S	70
C82S-focA rev	GGCTCCCGAGACAACAGAAAGAATCAG	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch C82S	70
L89A-focA for	TGTCTGCGGAGCCGATGCCTTTACTTCCACCGTG	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch L89A	79
L89A-focA rev	CACGGTGAAGTAAAGGCATCGGCTCCGCAGACA	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch L89A	79
F90Y-focA for	GCGGAGCCGATCTCTATACTTCCACCGTGTT	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch F90Y	79
F90Y-focA rev	AACACGGTGAAGTATAGAGATCGGCTCCGC	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch F90Y	79

K156E-focA for	TACAAACCGCCGACCACGAAGTGCACCATACTTTT	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch K156E	75
K156E-focA rev	AAAGTATGGTGCACCTTCGTGGTCGGCGGTTTGTA	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch K156E	75
V175A-focA for	CTGGCAAACCTGATGGCATGTCTGGCAGTATGG	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch V175A	76
V175A-focA rev	CCATACTGCCAGACATGCCATCAGGTTTGCCAG	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch V175A	76
C176S-focA for	ATCCTGGCAAACCTGATGGTAAGTCTGGCAGTATG	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch C176S	80
C176S-focA rev	CATACTGCCAGACTTACCATCAGGTTTGCCAGGAT	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch C176S	80
W180F-focA for	GATGGTATGTCTGGCAGTATTCATGAGTTATTCTGGCCGCA	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch W180F	79
W180F-focA rev	TGCGGCCAGAAATAACTCATGAATACTGCCAGACATACCATC	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch W180F	79
D190A-focA for	GGCCGCAGCCTGATGGCCAAAGCGTTCATTATG	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch D190A	80
D190A-focA rev	CATAATGAACGCTTTGGCCATCAGGCTGCGGCC	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch D190A	80
D190K-focA for	GGCCGCAGCCTGATGAAGAAAGCGTTCATTATG	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch D190K	75
D190K-focA rev	CATAATGAACGCTTTCTTCATCAGGCTGCGGCC	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch D190K	75
K191A-focA for	GGCCGCAGCCTGATGGACGCAGCGTTCATTATG	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch K191A	79
K191A-focA rev	CATAATGAACGCTGCGTCCATCAGGCTGCGGCC	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch K191A	79
F202A-focA for	CTGCCGGTCGCGATGGCTGTTGCCAGCGGTTT	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch F202A	80
F202A-focA rev	AAACCGTTGGCAACAGCCATCGCGACCGGCAG	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch F202A	80
F207A-focA for	GATGTTTGTGGCCAGCGGTGCGGAGCACAGTATCGCAAAC	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch F207A	81
F207A-focA rev	GTTTGCGATACTGTGCTCCGCACCGCTGGCAACAAACATC	<i>reverse</i> Primer für AS-Austausch F207A	81
E208A-focA for	GTTGCCAGCGGTTTTGCGCACAGTATCGCAAAC	<i>forward</i> Primer für AS-Austausch E208A	76

E208A-focA rev	GTTTGCGATACTGTGCGCAA <u>AA</u> ACCGCTGGCAAC	reverse Primer für AS-Austausch E208A	76
H209Y-focA for	GTTTGTGCCAGCGGTTTTGAGTATAGTATCGCAAACATGTTTATGA	forward Primer für AS-Austausch H209Y	79
H209Y-focA rev	TCATAACATGTTTGCGATACTATACTCAA <u>AA</u> ACCGCTGGCAACAAAC	reverse Primer für AS-Austausch H209Y	79
N213D-focA for	GTTTTGAGCACAGTATCGCAGACATGTTTATCCCG	forward Primer für AS-Austausch N213D	76
N213D-focA rev	CGGGATCATAAACATGTCTGCGATACTGTGCTCAA <u>AA</u> AC	reverse Primer für AS-Austausch N213D	76
Primer für THS-Konstrukte			
pKT25focA for	ACTTCTGCAGGAAAAGCTGACAACCCTTTTGAT	forward Primer für Konstruktion der THS Plasmide	71
pKT25focA rev	ACGGAATTCTTAATGGTGGTCGTTTTACGCAG	reverse Primer für Konstruktion der THS Plasmide	73
pKNT25focA for	TACTGCTGCAGGAAAAGCTGACAACCCTTTTGAT	forward Primer für Konstruktion der THS Plasmide	73
pKNT25focA rev	AGATGGAATTCCATGGTGGTCGTTTTACGCAG	reverse Primer für Konstruktion der THS Plasmide	74
pUT18CpfIB for	AACTGCAGGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTAGCCACA	forward Primer für Konstruktion der THS Plasmide	74
pUT18CpfIB rev	ATCGAATTCTTACATAGATTGAGTGAAGGTACGAGTAAT	reverse Primer für Konstruktion der THS Plasmide	72
pUT18CpfIB (1-424) for	AACTGCAGGTCCGAGCTTAATGAAAAGTTAGCCACA	forward Primer für Konstruktion der THS Plasmide	77
pUT18CpfIB (1-424) rev	ATCGAATTCTTATTTACCAACGATCATCGGGCT	reverse Primer für Konstruktion der THS Plasmide	75
pUT18pfIB (414-603) for	ATCTGCAGGAGCCCGATGATCGTTGGTAAA	forward Primer für Konstruktion der THS Plasmide	78
pUT18pfIB (414-603) rev	ACGAATTCATTAAGAAGTGATGGTCAGAACAGA	reverse Primer für Konstruktion der THS Plasmide	72
pUT18CpfIB (603-752) for	AACTGCAGGTCTGTTCTGACCATCACTTCT	forward Primer für Konstruktion der THS Plasmide	73
pUT18CpfIB (603-752) rev	ATCGAATTCTTACATAGATTGAGTGAAGGTACGAGTAAT	reverse Primer für Konstruktion der THS Plasmide	72

Unterstrichen ist die Basenabfolge, die verändert wurde


```

E. coli          MKADNPFDLLLPAAMAKVAEEAGVYKATKHPLKTFYLAITAGVFISIAFVFIYITATTG-- 58
S. typhimurium  MKADNPFDLLLPAAMAKVAEEAGVYKATKHPLKTFYLAITAGVFISIAFVFIYITATTG-- 58
V. cholerae     -MEHNQFDSLPPQMAERAAITGEGKAKKAAYKSFLLAISAGIQIGIAFVFIYTVVTTG-- 57
T. tengcongensis ---MGFKMPKDIT---EGMSSLGKAKSELSISKLLVLGFLGGAYIALGLLAIRAAG--- 51
T. gammatolerans MVDAKEKILYGVDTTFEIGAKKATPKFKTTPGRLLFAGFMAGAFIAGFLLAVVAGCIAG 60
                :      .  *      : : . : . * * : . : .

E. coli          -----TGTMPFGMAKLVGGICFSLGLILCVVCGADLFTS--TVLIVVAKASGRITWVQLA 111
S. typhimurium  -----TGAMPYGMAKLIGGICFSLGLILCVICGADLFTS--TVLIVVAKASGRITWVQLA 111
V. cholerae     -----AHDMPYGVTKLLGGLAFSLGLILVVIITGGELFTS--SVLILVAKASGKISWKELV 110
T. tengcongensis ----ALPDSFG--SLQKFIGGAVFPLGLILVVIAGAEIIVTGNMMPQPMAYFDRKIDLKGLL 106
T. gammatolerans YPPFAVGDTTFNKALLKILLGAVFPVGLIAVVLLGGADLWTGNVQFLSSAKVKGYADFKCVL 120
                :      . : : * * : : * * * * : * : * * *      *      .      :

E. coli          KNWLNVFYFGNLVGALLFVLLMWLSGEYMTANGQ-----WGLNVLQADHKKVHHTFI 162
S. typhimurium  KNWLNVFYFGNLIGALLFVLLMWLSGEYMTANGQ-----WGLNVLQADHKKMHHTFI 162
V. cholerae     RNWTVVYFGNLCSIIILVIMLATRQFMEDGGQ-----LGLNAMAISOHKLHHTFL 161
T. tengcongensis KNWTFVYIGNFIGSVFVAYFLAYKTGLIMEVAKMGEIPKALPWALYAVKIANAKVSLSWL 166
T. gammatolerans YNWFSGYGGNFIGSIFLALMAIPLTGLFGHVGDPNLFKKTV-----VAIAHGKLVSKDIL 174
                **      * * * : * : : . : :      :      . .      :      . : * :

E. coli          EAVCLGILANLMVCLAVWMSYSGRSLMDKAFIMVLPVAMFVASGFEHSIANMFMIPMGIV 222
S. typhimurium  EAVCLGILANLMVCLAVWMSYSGRSLMDKAFIMVLPVAMFVASGFEHSIANMFMIPMGIV 222
V. cholerae     QAFALGLMCNLIIVCLAVWMTFSARSLTDKVMVLILPAMFVSSGFEHSIANMFMIPMAIG 221
T. tengcongensis QAFLRGIGCNWLVALAVWMAESAEDIIGKIFAIWWPIMGFVAIGFEHSVANMFFIPLGIY 226
T. gammatolerans ALFFLGI GCNWL VNLAIWQSARVQDAGAKILAIWFPIFAFVAIGFEHAIANMWAIPTGII 234
                . * : . * : * * * : * : . . * : : * : * * : * * * : * * * : * *

E. coli          IR-----DFASPEFWTAVGSAP-----ENFSHLTVMN----- 249
S. typhimurium  IR-----DFATPEFWTAVGSSP-----ESFSHLTVMN----- 249
V. cholerae     IK-----YFAPESFWAMTGANI-----AQYADLNFVN----- 248
T. tengcongensis AG-----QDPLYVNFSAEGIL-----LNVPIPKATWEN----- 256
T. gammatolerans ASNYAVTWSQFFHNVIPVTFGNVAVGGFLFVAFYVWYLSHPELTAERLVKEIVDFVVFVAV 294
                *      . .

E. coli          -FITDNLIP---VTIGNIIGGGLLVGLT----YWVIYLRENDHH----- 285
S. typhimurium  -FITDNLIP---VTIGNIIGGGLLVGLT----YWVIYLRGNEHHLEHHHHHH 293
V. cholerae     -FIVNNLIP---VTLGNIVGGVVFVGMW----YWLIYLDK----- 280
T. tengcongensis -FIVNNLIP---VTLGNIVGAGFFVAT----IYWYVYRK----- 287
T. gammatolerans FWILATLIPAGIGIALDKAMGRGAMYAVPVVLSIYYIVGTFALAKVAKPA---- 344
                : * . * * : : : : : * * : .      * : :

```

Abb. 37 Alignment der AS Sequenzen verschiedener FocA Proteine aus unterschiedlichen Organismen mit FocA aus *E. coli*

* markiert identische AS; : kennzeichnet konservierte AS; . kennzeichnet semikonservierte AS; der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programms CLUSTAL W 2.0.12 (Thompson *et al.*, 1994) erstellt

```

FocA      MKADNPFDLLLPAAMAKVAEEAGVYKATKHPLKTFYLAI TAGVFISIAFVFYITATTGTG 60
NirC      -----MFTDTITKCAANAARIARLSANNPLGFWVSSAMAGAYVGLGIILIFTLGNLLD 53
FocB      MRNKLSFDLQLSARKAAIAERIAAHKIARSKVSVFLMAMSAGVFMAIGFTFYLSVIADAP 60
Hsc       -----RAHKETLDKLTNAAINKINLLNTSKVKYLVSSAFAGLYVGIGILLIFTIGLLT 54
          .                               :           : ** :.:.: : : :

FocA      TMPFGMAKLVGGICFSLGILLCVVCADLFT-STVLIVVAKASGRITWQQLAKNWLNVYF 119
NirC      PS---VRPLVMGATFGIALTLVI IAGSELTGHTMFLTFGVKAGTISHGQMWAILPQTWL 110
FocB      SS-QALTHLVGGLCFALGFILLAVCGTSLFT-SSVMTVMAKSRGVISWRTWLINALLVAC 118
Hsc       DAGSPMTKIVMGLSFAIALSLVIMTGTELTGNNMVMSAGMLNKGVS IKDTSKIWAYS 114
          : * * * .:.: * : :*.*** .:. . : :

FocA      GNLVGALLFVLLMWLSGEYMTANGQWGLNVLQADHKVHHTFIEAVCLGILANLMVCLAV 179
NirC      GNLVGSVVFVAMLYSWGGSLLP--VDTSIVHSVALAKTTAPAMVLFKFGALCNWLVCLAI 168
FocB      GNLAGIACFSLLIWFSGLVMSENAMWGVAVLHCAEGKMHTFTESVSLGIMCNLMVCLAL 178
Hsc       GNLIGALVLGII FVGTGLVDKG--PVAEFFANTAASKASMPFTALFFRGILCNILVCSV 172
          *** * . : : * . * * . . * :.* :*.:.:

FocA      WMSYSGRSLMDKAFIMVLPVAMFVASGF EHSIANMFMIPMGIVIRDFASPEFWTAVGSAP 239
NirC      WMALRTEG-AAKFIAIWWCLLAFIASGYEHSIANMTL FALS WFG----- 211
FocB      WMSYCGRSLCDKIVAMILPITL FVASGF EHCIANL FVIPFAIAIRHFAPPPFWQLAHSSA 238
Hsc       LCSFRTNSDTAKIIMIFLCLFAFITSGFEHSVANMTIYSVSLFS----- 216
          : .. * . : : *.:*:*.*.: : ...

FocA      ENFSHLTVMNFITDNLIPVTIGNIIGGGLLVGLTYWVIYLRENDHH----- 285
NirC      -NHSEAYTLAGIGHNLLWVTLGN T LSGAVFMGLGYWYATPKANRPVADKFNQTETAA 267
FocB      DNFPAITVSHFITANLLPVMLGNIIGGAVLVSMCYRAIYLRQES----- 282
Hsc       -PTISTVTIGGAIYNLVAVTLGNIVGGALFMGLG-TYILGKEK----- 257
          . ** : * : * * .:.: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
    
```

Abb. 38 Alignment verschiedener Mitglieder der FNT-Familie

* markiert identische AS; : kennzeichnet konservierte AS; . kennzeichnet semikonservierte AS; der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programms CLUSTAL W 2.0.12 (Thompson *et al.*, 1994) erstellt

PflB	-----MSELNEKLATAWEGFTKGDWQNEVNVDRDFIQKNYTPYEGDESFLAGATEATTLW	55
PflD	-----MTNRI SRLKTALFANTR-EISLERALLYTASHROTEGEPVILRRAKATAYIL	51
PflF	MTTLKLDTLSDRIKAHKNALVHIKPPVCTERAQHYTEMYQQHLDKPIPVRRALALHHL	60
TdcE	-MKVDIDTSDKLYADAWLGFKGTDWKNEINVRDFIQHNYTPYEGDESFLAEATPATTELW	59
	. : * : . . . : * :	
PflB	DKVMEGVKLENRTHAPVDFDTAVASTITSHDAGYINKQLEKIVG-----LQTEAPL	106
PflD	EHVEISIRDEELIAGNRTVKPRAGIMSPENDPYWLLKELDQFPTRPQDRFAISEEDKRIY	111
PflF	ANRTIWIKHDELIIGNQASEVRAAPIFPEYTVSWIEKEIDDLADRPAGFAVSEENKRVL	120
TdcE	EKVMGIRIENATHAPVDFDTNIATTTIHAHDAGYINQPLEKIVG-----LQTDAPL	110
	: : : : . . . : : : : :	
PflB	KRALIPFGGKMIIEGSKAYNRELDP---MIKKIFTEYRKTHNQGVFVDVYTPDILRCRKS	163
PflD	REELFPYWEKRSMKDFINGQMTDEVKAA'NTQIF SIN-QTDKGGQHIIIDYPRLLNHGLG	170
PflF	-HEVCPWWRGQTVQDRCYGMFTDEQKGLLATGIIKAEGNMTSGDAHLAVNFPLLLEKGLD	179
TdcE	KRALHPFGGINMIKSSFHAYGREMDS---EFEYLF'DLRKTHNQGVFVDVYSPDMLRCRKS	167
	. : * : . : . : . : : : * : * .	
PflB	GVLTGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGDYLMKDKLAQFTSLOADLENGVNLEQTIRLREE	223
PflD	ELVAQMQQHCQQQ-----PENHFYQAALLLLEASQKHLRYAELAE'NTMAANCT	218
PflF	GLREEVAERRSRINLT---VLEDLHGEQFLK AIDIVLAVSEHIERFAALAREMAATET	235
TdcE	GLTGLPDGYGRGRIIGDYRRVALYGISYLVRRERELQFADLQSRLEKGEDLEATIRLREE	227
	: : : : . : : : . : . * :	
PflB	IAEQHRALGQMKEMAAYGYDISGPATNAQEAIQWTFYGLAAVKSQNGAAMSGRGTSTF	283
PflD	DAQREELLTIAEISRHN---AQHKPQTFWQACQLFWYMNIILOYESNASSLSLGRFDQY	275
PflF	RESRDEL LAMAENCDLI---AHQPPQTFWQALQLCYFIQLILQIESNGHSVSGFRMDQY	292
TdcE	LAEHRHALQIQEMAAYGFDIRSPAQNAQEA'VQWLYFAYLAAVKSQNGGAMSLGR'ASF	287
	. : : * : * . . . : * * : : : . : . * : * * * :	
PflB	LDVYIERDLKAGKITEQE-AQEMVDHLVMKLRMVRFLRTPEYDELFSGDP'IWATESIGG-	341
PflD	MLPFYQ--TSLTQGEDAAFLKELLESLWVKCNDIVLLRSTSSARYFAGFPTGYTALLGG-	332
PflF	LYPYRRDVELNQTLDRHAIEMLHSCWLKLELVNKIRSGSHSKASAGSPLYQNV'FIGGO	352
TdcE	LDIYIERDFKAGVLNEQQ-AQELIDHFIMKIRMVRFLRTPEFDSLFSGDP'IWATEVIGG-	345
	: : . : * : : * : : * : . : * * . : * * :	
PflB	--MGLDGRTLVTKNSFRFLNTLYTMGPSPEPNMTILWSEKPLPLNFKKFAAKVS-IDTSSL	398
PflD	--LTENGRSAVNVLSFLCLDAYQSVQ-LPQPNLGVRTNALIDTPFLMKTAETIRFGTGIP	389
PflF	NLVDGQPMDAVNPLSYAILESCGRRLR-STQPNLSVRYHAGMSNDFLDACVQVIRCGFGMP	411
TdcE	--MGLDGRTLVTKNSFRYLHTLTMGPAPEPNLTILWSEELPIAFKKYAAQVS-IVTSSL	402
	: : . * : * : * : : . : * * : : : * * : . .	
PflB	QYENDDLMRPDFNND-----DYAIACCVSPMIVGKMQFFGAR--ANLAKTMLYAIN	448
PflD	QIFNDEVVPAFLNRGVSLEDARDYSVVGCVELSIPGRT-YGLHDIAMFLLKVMELCLH	448
PflF	AFNNDEIVIPEFIKLGIEPQDAYDYAAIGCIETAVGGK'WGYRCTGMSFINFARVMLAAL	471
TdcE	QYENDDLMRTDFNSD-----DYAIACCVSPMIVGKMQFFGAR--ANLAKTLLYAIN	452
	* : : : . * . * : * : * : * : * : * : : : . .	
PflB	GG-VDEKLMQVGP'KSEPIKGDVLN'YDEVMERMDHFMDWLAKQYITALNIIHYMHDKYSY	507
PflD	E---NEGNAALT-----YEGLEQIRAKISHYITLMVEGSNICDIGHRD'WAP	492
PflF	GGHDATSGKVFLPQEKALSAGN'FNDFEVMDAWDTQIRYTRKSEIEYVVD'TMLEENVH	531
TdcE	GG-VDEKLIQVGPKTAPLMD'DVLDYDKVMDSLDHFMDWLAVQYISALNIIHYMHDKYSY	511
	. : : : : : : : . : . .	
PflB	EASLMALH'DR'DVIR-----TMACGIAGLSVAADSLSAIKYAKVKPIR'DED	552
PflD	VPLLSSFISDCLEKGRDITDGGARYNFSVQ'GIGIANLSDSLHALKGMVFEQQRLS'FDEL	552
PflF	DILCSALVDDCIERAKS'IKQGGAKYDWVSGLQV'GIANLGNLSLAAVKKLVFEQGAIGOOQL	591
TdcE	EASLMALH'DR'DVYR-----TMACGIAGLSVATDSLSAIKYARVKPIR'DEN	556
	: : . : : * : * . : : : : : : :	
PflB	GLAIDFEIEG-----EYPQFGNNDPRVDDLAVDLVERFMKKIQKLHTYR----	596
PflD	LSVLKANFATPEGEKVRARL'INRFEKYGNDIDEVDNISAE'LLRHYCKEVEKYQ'NPR----	608
PflF	AAALADDFDGLTHEQLRQRLINGAPKYGNDDDTVD'TLLARAYQTYIDELKQYHNPRYGRG	651
TdcE	GLAIDFEIDG-----EYPQYGNNDERVDSIACDLVERFMKKIKALPTYR----	600
	. : : : : : * : * : . : : : . *	
PflB	--DAIPTQSVLTTITSNVVYGKKTGNTPDGRRAGAPFGPG-ANPMHGRDQKGA'VASLTSVA	653
PflD	--GGYFTPGSYTVSAHVPLG'SVVGATPDGRFAGEQLADGGLSPMLGQDAQ'GPTAVLKSVS	666
PflF	PVGGNYIAGTSSISANV'PFGAQTMATPDGRKAHTPLAEG-ASPASGTDHLGPTAVIGSVG	710
TdcE	--NAVPTQSILTTITSNVVYGKKTGNTPDGRRAGTPFAPG-ANPMHGRDRKGA'VASLTSVA	657
	. . : : : * * . * * * * * : . * * * * * * * * * * :	
PflB	KLPFAYAKDGISYTF'SIVPNALGKDEVRKTNLAGLMDGYFHHEASIEGGQHLN'VNMNR	713
PflD	KLDNTLLSNGTLLNVKFTPATLEGEAGLRK-----LADFLRAFTQLKL-OHIQFN'VNA	719
PflF	KLPTAAILGGVLLNQKLN'PATLENESDKQK-----LMILLRTFFEVHKGW'HIQYNIIVSR	764
TdcE	KLPFTYAKDGISYTF'SIVPAALGKEDPVRKTNLVGLLDGYFHHEADVEGGQHLN'VNMNR	717
	** : . * . . : * * : : * : : : . . * : * : :	

```

PflB      EMLLDAMENPEKYPQLTIRVSGYAVRFNSLTKEQQQDVITRTFTQSM 760
PflD      DTLREAQRPODYAGLVVRVAGYSAFFVELSKEIQDDIIRRTAHQL- 765
PflF      ETLLEDAKKHPDQYRDLVVRVAGYSAFFTALSPDAQDDIIARTEHML- 810
TdcE      EMLLDAIEHPEKYPNLTIRVSGYAVRFNALTREQQQDVISRTFTQAL 764
          : * : * : . * : . * * . * . : * * : * * : . * * * : * * : * : * * : * *

```

Abb. 39 Alignment verschiedener Vertreter der GRE-Familie aus *E. coli*

* markiert identische AS; : kennzeichnet konservierte AS; . kennzeichnet semikonservierte AS; der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programms CLUSTAL W 2.0.12 (Thompson *et al.*, 1994) erstellt

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz sehr bei Prof. Dr. Gary Sawers für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Zudem danke ich ihm für die stetige Unterstützung, die Übernahme des Erstgutachtens, Ratschläge, Hilfsbereitschaft bei der Lösung von Problemen und kniffligen Fragestellungen und die tolle Unterstützung meiner beruflichen Zukunft.

Prof. Dr. Behrens und Prof. Dr. Uden danke ich für die Bereitschaft, das Zweit- bzw. Dritt-Gutachten für diese Arbeit zu übernehmen und anzufertigen.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Mikrobiologie. Speziell den Kollegen des Labors 211, ohne euch wäre viel von dieser Arbeit nicht realisierbar gewesen und die letzten 3 Jahre nur halb so witzig.

Barbara Thiemer danke ich für die viele Hilfe in den Anfängen dieser Arbeit, Lydia für die besten Labortänze und natürlich auch die Hilfe bei sonstigen Alltagsproblemchen, Dörte für die grandiose Vorarbeit bei den Interaktionsstudien, sowie Claudia Hammerschmidt für die tolle Unterstützung bei allen kleinen und großen Laborproblemen. Natürlich danke ich auch Linda und Marcus für viele tolle Momente im Labor.

Speziell möchte ich mich noch bei Claudia Bielak und Doreen Hunger bedanken, deren Arbeit ich betreuen durfte, deren Ideen auch mich sehr viel weiter gebracht haben und deren Ehrgeiz auch immer meinen stärkte.

Natürlich will ich mich auch bei allen anderen Doktoranden für die witzigen VAAM Tagungen und lustigen, aber auch informativen Gespräche bedanken: Janine, Hannes, Conny, Marlen, Marco, Konny, Steffi und Lydia.... danke.

Ein extra Dank geht auch an das Labor 262, bei dem ich immer ein Plätzchen zum reden, scherzen und lachen fand, auch als Anja nicht mehr da war.

Dem GRK 1026 danke ich für die finanzielle Unterstützung, die großartigen Meetings /Seminare sowie die konstruktiven Tipps und Anregungen.

Ebenfalls danke ich den AG Stubbs, AG Sinz und AG Rudolf für die gute Zusammenarbeit.

DANKE an meine Freunde, ohne euch wäre manches nicht machbar gewesen. Ich danke euch für die Unterstützung, die tollen Feiern, Urlaube, Serienabende und Umzüge, die euch definitiv unvergesslich machen. Ein besonderer Dank soll hierbei an Silvio, Kati, Anja, Jessi, Doreen, Inge und Sabrina auf die ich mich immer zu 100 % verlassen konnte und die immer für mich da waren.

Der größte Dank gilt jedoch meiner ganzen Familie. Meiner Mama danke ich für den Halt, die Unterstützung und die Zuversicht in allen Lebenslagen, du bist die Beste. Meiner Schwester Jane danke ich für ihre Hilfe bei privaten und beruflichen Fragen, den „Unterschlupf“ im Sommer und einfach nur für die Tatsache, dass du meine Lieblings-Schwester bist. Meiner kleinen Stella danke ich für den Sonnenschein, den sie in mein Leben gebracht hat.

Lebenslauf

... persönliche Daten

geboren am 20.02.1984 in Mittweida
 wohnhaft in 48149 Münster, Horstmarer Landweg 74
 erreichbar unter Tel.: 0049173/3977904
 E-Mail: ClaudiaDoberenz@gmail.com
 Familienstand ledig

... berufliche Tätigkeiten

seit 07/2012 **Laboratory and Material Manager R & D** (unbefristete Anstellung)
 Medskin Solutions Dr. Suwelack,
 Billerbeek

06/2009 - 08/2012 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** (befristete Anstellung)
 am Institut für Biologie/Mikrobiologie
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

12/2007 - 06/2008 **Projektmitarbeiterin** (Teilzeit während des Studiums)
 Rottendorf Pharma GmbH, Ennigerloh

... Auslandsaufenthalte

08/2008 - 05/2009 **Fulbright Fellowship**
 am Center of Biofilm Engineering
 Montana State University, Bozeman, MT, USA

06/2008 - 08/2008 **Fulbright Preacademic Training**
 an der Ohio University, Athens, OH, USA

... universitäre Ausbildung

06/2009 - 07/2012 **Promotion**
 am Institut für Biologie/Mikrobiologie
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Stipendium des Graduiertenkolleg 1026
 „Conformational transitions in macromolecular interactions“

10/2003 - 06/2008 **Studium der Biologie**
 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Abschluss: Diplom-Biologin (Gesamtnote 1,3)
 Thema: Nachweis der Aktivität von Proteinen, die am
 Detoxifizierungsmechanismus von reaktiven Sauerstoffspezies in
Eubacterium acidaminophilum beteiligt sind

... Schulausbildung und Praktika

08/1994 - 06/2002 **Abitur** (Allgemeine Hochschulreife)
 am Städtischen Gymnasium Mittweida (Gesamtnote 1,9)

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe.

Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Die den genutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Münster, den 01.10.2012

Claudia Doberenz