

**Die Bedeutung von AtpI für die F_1F_0 -ATPase in *Escherichia coli*
und *Cupriavidus metallidurans***

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Anja Heinz

geb. am 18.04.1986 in Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. D. H. Nies
2. Prof. Dr. R. G. Sawers
3. Prof. Dr. K. Altendorf

Tag der Verteidigung: 25.09.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das <i>atp</i> -Operon und seine Transkription	2
1.2 Die post-transkriptionale Regulation des <i>atp</i> -Operons	3
1.3 Bau und Funktion der F ₁ F ₀ -ATPase	4
1.3.1 Bau und Funktion eines mit Protonen getriebenen Motors	5
1.3.2 Der katalytisch aktive Teil der F ₁ F ₀ -ATPase	5
1.3.3 Der Stator und die Spindel der F ₁ F ₀ -ATPase	6
1.3.4 Die besondere Funktion von AtpC	7
1.4 Der Zusammenbau des Enzymkomplexes	8
1.5 Welche Rolle spielt AtpI?	9
1.6 Fragestellungen	10
2 Materialien und Methoden	12
2.1 Anzucht der Mikroorganismen	12
2.1.1 Anzucht von <i>C. metallidurans</i> und das Messen von Wachstumskurven	13
2.1.2 Anzucht von <i>E. coli</i>	14
2.2 Genetische Arbeiten	15
2.2.1 RNA Isolation und DNaseI-Verdau	15
2.2.2 Trennung der RNA über ein Formaldehyd-Agarosegel	16
2.2.3 Synthese von cDNA	16
2.2.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) und <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)	17
2.2.5 Restriktionsverdau mit Endonukleasen und Ligation	23
2.2.6 <i>Quick-Change site-directed mutagenesis</i> -PCR (nach Zheng <i>et al.</i> 2004)	31
2.2.7 Isolierung und Reinigung von DNA	32
2.2.8 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	32
2.2.9 Trennung von DNA über ein Agarosegel	32
2.2.10 Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese	33
2.3 Methoden zur Aufnahme fremder DNA	33
2.3.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation	33
2.3.2 Herstellung elektrisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation (Dower <i>et al.</i> , 1988)	34
2.3.3 Die Konjugation von <i>C. metallidurans</i>	34
	I

Inhaltsverzeichnis

2.3.4	Integration von Genen in das Chromosom von <i>E. coli</i> (nach Choi <i>et al.</i> , 2005; Choi und Schweizer, 2006)	35
2.4	Proteinbiochemische Methoden	35
2.4.1	Zellernte und Proteinextraktion	35
2.4.2	Protein-Reinigung über die <i>Strep</i> -Tactin®-Säule	36
2.4.3	Protein-Reinigung über die Ni-NTA-Säule	36
2.4.4	Pufferwechsel und Konzentration der gereinigten Proteine	36
2.4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
2.4.6	Proteintrennung über ein denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel (nach Laemmli, 1970)	37
2.4.7	Gewichtstandards für die Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen in SDS-Gelen	38
2.4.8	Coomassie-Färbung von Proteinen (nach Weber und Osborn, 1969)	38
2.4.9	Western Blot (nach Towbin <i>et al.</i> , 1979)	39
2.4.10	Proteinnachweis mittels <i>Strep</i> -Tactin®-HRP-Konjugat	39
2.4.11	Nachweis von <i>His-tag</i> , <i>PhoA</i> und <i>LacZ</i>	39
2.4.12	Chemilumineszenz und Detektion	40
2.4.13	Reinigung des Anti- β -Galaktosidase Antikörpers	40
2.4.14	Der <i>Pulldown-Assay</i>	41
2.5	Reporter-Assays und ihre Anwendungen	41
2.5.1	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (verändert nach Miller, 1972; Miller, 1992)	41
2.5.2	Bestimmung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität (verändert nach Manoil 1991)	42
2.5.3	Transkriptionale Reporterfusionen für das Messen der Promotoraktivität	43
2.5.4	Translationale Reporterfusionen für das Messen der Promotoraktivität	44
2.5.5	Erstellung der Plasmide und Anzuchtbedingungen für die Proteintopologie	44
2.5.6	Der <i>Bacterial Two Hybrid</i> (BACTH)-Assay (nach Karimova <i>et al.</i> , 1998; Karimova <i>et al.</i> , 2001; Karimova <i>et al.</i> , 2005)	45
2.6	Fluoreszenzmikroskopie	46
2.7	Bioinformatische Analysen	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Die Transkription und Translation des <i>atp_{Eco}</i> -Operons	48
3.1.1	Die Aktivität der <i>atp</i> Promotoren von <i>E. coli</i> – die transkriptionale Fusion mit <i>lacZ</i>	48
3.1.2	Die Translationseffizienz der ersten Gene des <i>atp_{Eco}</i> -Operons	53
3.2	<i>atpI</i> und das <i>atp</i> -Operon von <i>C. metallidurans</i>	55
3.2.1	Die Identifizierung des Startcodons von <i>atpI_{Cmet}</i>	55
3.2.2	<i>atpI_{Cmet}</i> als Teil des <i>atp_{Cmer}</i> -Operons	59

Inhaltsverzeichnis

3.2.3	Existiert ein Promotor in dem intergenischen Bereich zwischen <i>atpI_{Cmet}</i> und <i>atpB_{Cmet}</i> ?	62
3.3	AtpI von <i>E. coli</i> – Topologie und Interaktion mit anderen Proteinen	64
3.3.1	Die Topologie der Transmembrandomänen von AtpI _{Eco}	65
3.3.2	Lokalisierung von AtpI _{Eco} in der Membran mittels Fluoreszenzmikroskopie	67
3.3.3	Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen mit dem BACTH-Assay	69
3.3.4	Experimentelle Ermittlung von Protein-Protein-Interaktionen <i>in vitro</i> (Pull-down-Assay)	80
3.4	Welche physiologische Rolle spielt <i>atpI_{Eco}</i> ?	82
4	Diskussion	87
4.1	Die Promotoraktivität des <i>atp_{Eco}</i> -Operons	87
4.2	Das Operon von <i>C. metallidurans</i>	90
4.3	Ein Vergleich von AtpI _{Cmet} und AtpI _{Eco}	92
4.4	Die Lokalisierung von AtpI _{Eco} in der Membran	94
4.5	AtpI _{Eco} interagiert mit Untereinheiten der F ₁ F _o -ATPase	96
4.5.1	Das Verhältnis von AtpI _{Eco} zur F ₁ F _o -ATPase	98
4.5.2	AtpI _{Eco} interagiert mit Komponenten des F _o -Komplexes	102
4.5.3	Die Interaktion von AtpI _{Eco} mit AtpC _{Eco} und dessen Bedeutung	104
4.6	Die physiologische Funktion von AtpI	106
4.6.1	Eine mögliche Funktion von AtpI bei pH-Wert-Schwankungen	107
4.7	Ausblick	109
5	Zusammenfassung	110
6	Literaturverzeichnis	111
7	Anhang	142

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das <i>atp</i> -Operon von <i>E. coli</i>	2
Abb. 2: Ausschnitt der Sequenz von <i>atpI_{Eco}</i> mit der Lokalisierung der Promotoren <i>atpBp_{1Eco}</i> und <i>atpBp_{2Eco}</i>	3
Abb. 3: Der Bau der F ₁ F ₀ -ATPase.	8
Abb. 4: Konstrukte für die Integration ins Chromosom von <i>E. coli</i>	46
Abb. 5: Schematische Darstellung der für die transkriptionalen Fusionen mit <i>lacZ</i> verwendeten Regionen aus <i>E. coli</i>	49
Abb. 6: Aktivitäten der Promotoren des <i>atp_{Eco}</i> -Operons.	50
Abb. 7: Einfluss der C-Quelle auf die Aktivitäten der Promotoren des <i>atp_{Eco}</i> -Operons.....	51
Abb. 8: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivitäten der Promotoren des <i>atp_{Eco}</i> -Operons.	52
Abb. 9: β -Galaktosidase-Aktivitäten der translationalen Fusionen mit <i>lacZ</i>	54
Abb. 10: Vorhersage der Topologie von AtpI.....	56
Abb. 11: <i>Multiple sequence alignment</i> von AtpI _{Eco} (Eco) und AtpI _{Cmet} (Cmet).....	57
Abb. 12: Die Ermittlung des Startcodons von AtpI _{Cmet}	58
Abb. 13: β -Galaktosidase-Aktivitäten der translationalen Fusionen von <i>atpI_{Cmet}'</i> mit <i>lacZ</i> über die Zeit.....	59
Abb. 14: Der intergenische Bereich zwischen <i>atpI_{Cmet}</i> und <i>atpB_{Cmet}</i>	60
Abb. 15: Ermittlung der Zugehörigkeit von <i>atpI_{Cmet}</i> zum <i>atp_{Cmet}</i> -Operon mittels RT-PCR....	61
Abb. 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der RT-PCR.....	62
Abb. 17: Die Promotoren des <i>atp_{Cmet}</i> -Operons.	63
Abb. 18: Die Lokalisierung des N- und C-Terminus von AtpI _{Eco}	67
Abb. 19: Mikroskopische Aufnahmen von ECB174 und ECB175.....	68
Abb. 20: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit dem <i>BACTH</i> -Assay.	71
Abb. 21: <i>Multiple sequence alignment</i> von AtpI verschiedener Organismen.....	75
Abb. 22: Lokalisierung von AtpI _{Eco} Mutanten nach der Fraktionierung des Proteinextraktes.76	
Abb. 23: Die Membrantopologie der AtpI _{Eco} Mutanten.....	77
Abb. 24: Protein-Protein-Interaktionen mit AtpI _{Eco} -Mutanten.	78
Abb. 25: Die Interaktion von Strep-AtpI _{Eco} und His-AtpC _{Eco} <i>in vitro</i>	81
Abb. 26: Wachstum unter pH-Stress.....	83
Abb. 27: Wachstum unter pH-Stress bei unterschiedlicher Glukosekonzentration.	84
Abb. 28: Der Einfluss von DNP auf das Wachstum.	86
Abb. 29: Der Start des <i>atp_{Cmet}</i> -Operons.	91

Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

Abb. 30: Modell der Interaktion von AtpI _{Eco} mit der F ₁ F ₀ -ATPase.....	105
Abb. A 1: Der vorhergesagte Promotor im intergenischen Bereich von <i>atpI_{Cmet}</i> und <i>atpB_{Cmet}</i>	142
Abb. A 2: Die Lokalisation von AtpB'-mCherry innerhalb der Zelle.	142
Abb. A 3: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen des Wildtyp-AtpI _{Eco} und AtpI _{Eco} ^{V88G}	143
Abb. A 4: Protein-Protein-Interaktionen von AtpI-Mutanten mit Untereinheiten der F ₁ F ₀ - ATPase.	144
Abb. A 5: Affinitätschromatographie von Strep-AtpI _{Eco} und His-AtpC _{Eco}	145
Abb. A 6: Bindung von Strep-AtpI _{Eco} an die Ni-NTA Matrix.	146
Abb. A 7: <i>Multiple sequence alignment</i> von AtpB verschiedener Organismen.	148

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Stämme	12
Tab. 2: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des TMM-Mediums	13
Tab. 3: Antibiotikakonzentrationen in Medien für <i>E. coli</i> und <i>C. metallidurans</i>	14
Tab. 4: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Primer	17
Tab. 5: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.....	24
Tab. 6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	38
Tab. 7: Vorhersage der Topologie von AtpI _{Eco} (VIMSS 17799)	65
Tab. 8: Topologie der Proteine des F ₀ -Komplexes	71
Tab. 9: Zusammenfassung der Ergebnisse des BACTH-Assays.....	72
Tab. A 1: Der Einfluss von pH-Stress auf die Verdopplungszeiten [h] während des exponentiellen Wachstums.....	146
Tab. A 2: Der Einfluss verschiedener Glukosekonzentrationen und pH-Stress auf die Verdopplungszeiten [h] während des exponentiellen Wachstums.....	146
Tab. A 3: Der Einfluss von DNP auf die Verdopplungszeiten [h] während des exponentiellen Wachstums.	147

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>AtpX/atpX_{Eco}</i>	Protein/Gen von <i>E. coli</i>
<i>AtpX/atpX_{Cmet}</i>	Protein/Gen von <i>C. metallidurans</i>
BACTH-Assay	<i>Bacterial Two Hybrid Assay</i>
BD	Bekton, Dickinson and Company
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DDM	<i>n</i> -Dodecyl β -D-maltosid
DEPC-H ₂ O	mit Diethylcarbonat behandeltes H ₂ O _{dd}
DNP	2,4-Dinitrophenol
DsRed	rot fluoreszierendes Protein von <i>Discosoma</i> sp.
DTT	Dichlordiphenyltrichlorethan
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FRET	Förster <i>Resonance Energy Transfer</i>
<i>FRT</i>	<i>Flp recombinase target</i>
<i>fw</i>	<i>forward</i>
H ₂ O _{dd}	Wasser, das mit der TKA Micro Pure Wasser- Aufbereitungsanlage gereinigt wurde
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i>
NEB	New England Biolabs GmbH
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen bei $\lambda=600$ nm
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
P _i	anorganisches Phosphat
PLG Reaktionsgefäß	<i>Phase Lock Gel Heavy</i> Reaktionsgefäß
RBS	Ribosomenbindestelle
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>

Abkürzungsverzeichnis

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
TMH, TMHs	Transmembranhelix, Transmembranhelices
TMM	Tris-Minimalmedium
TMM _{Gluc}	TMM für <i>E. coli</i> mit Glukose als Kohlenstoffquelle
TMM _{Glyc}	TMM für <i>E. coli</i> mit Glycerin als Kohlenstoffquelle
TMM _{NaGluc}	TMM für <i>C. metallidurans</i> mit Natrium-Gluconat als C-Quelle
TMM _{Succ}	TMM für <i>E. coli</i> mit Succinat als Kohlenstoffquelle
VIMSS-Nr.	<i>Virtual Institute of Microbial Stress and Survival</i> -Nr., Identifikationsnummer mit der man Sequenzen in MicrobesOnline.org (Dehal <i>et al.</i> , 2009) finden kann
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Aminosäurecode

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

1 Einleitung

Was ist Leben? Das Leben wird nach dem Erfüllen bestimmter Grundsätze definiert, die nach D. E. Koshland Jr. aus einem Programm, Improvisation, Kompartimenten, Energie, Regeneration, Adaption und abgeschlossenen Systemen bestehen (Koshland, 2002). Diese Arbeit beschäftigte sich mit einem Teilaspekt aus dem Baustein Energie – *atpI*.

Energie wird für viele Prozesse wie Biosynthese, Regulation, Transport von Molekülen und Motilität benötigt und kann in der Zelle in Form von chemischer Energie über Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert werden (Dimroth und von Ballmoos, 2008). Ein weit verbreiteter Weg der ATP-Gewinnung in Bakterien führt über die Glykolyse. Dabei wird ein Molekül Glukose in zwei Moleküle Pyruvat umgesetzt und in Summe 2 ATP gewonnen. Neben Glukose können auch andere Kohlenstoffquellen in der Glykolyse verstoffwechselt werden. Eine davon ist Glycerin, welches über die Umwandlung zu Dihydroxyacetonphosphat in diesen Stoffwechselweg eingeht (Anderson und Wood, 1969; Romano und Conway, 1996).

Das Endprodukt der Glykolyse, Pyruvat, geht nach der oxidativen Decarboxylierung zu Acetyl-CoA in den Citrat-Zyklus ein. Über verschiedene Zwischenprodukte wie α -Ketoglutarat, Succinat und Oxalacetat werden hier die Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 synthetisiert (Meléndez-Hevia *et al.*, 1996). Die im Citrat-Zyklus anfallenden Reduktionsäquivalente werden in der oxidativen Phosphorylierung dazu genutzt ATP herzustellen. Über verschiedene Enzyme der Atmungskette wie die NADH-Dehydrogenase (Komplex I), Cytochrom c-Reduktase (Komplex III) und -Oxidase (Komplex IV) werden Elektronen von NADH auf Sauerstoff übertragen (Price und Driessen, 2010). Bei der Umsetzung von Succinat zu Fumarat durch die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) werden die Elektronen direkt zu Komplex III weitergegeben und über eine Elektronentransportkette ebenfalls auf Sauerstoff übertragen (Ackrell, 2000; Cecchini *et al.*, 2002). Parallel zur Elektronenübertragung werden Protonen ins Periplasma transportiert. Der dabei über die Membran aufgebaute elektrochemische Protonengradient treibt den Komplex V der oxidativen Phosphorylierung an, die F_1F_0 -ATPase (Ingledeew und Poole, 1984), die ATP aus ADP und P_i synthetisiert. Die während der oxidativen Phosphorylierung aufgebaute Kraft aus Membranpotential und dem über der Membran liegenden Protonengradienten, die bei

Rückstrom in die Zelle über die F_1F_0 -ATPase an die ATP-Synthese gekoppelt ist, wird *proton motive force* genannt (Mitchell, 1966).

1.1 Das *atp*-Operon und seine Transkription

Die F_1F_0 -ATPase setzt sich aus insgesamt 8 verschiedenen Proteinen zusammen, die im *atp*-Operon kodiert sind. In *Escherichia coli* sind sie im *atpIBEFHAGDC*-Operon kodiert (Downie *et al.*, 1981; Downie *et al.*, 1980; Gay und Walker, 1981a; Gay und Walker, 1981b). Vor *atpI* befindet sich ein starker, konstitutiv exprimierter Promotor (Gay und Walker, 1981a; Kanazawa *et al.*, 1982; Nielsen *et al.*, 1984), dessen Transkriptionsstart 73 Basen vor dem Startcodon liegt (Jones *et al.*, 1983; Porter *et al.*, 1983). Die Transkription von diesem Promotor aus erfolgte sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen (Jones *et al.*, 1983) unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle (Kasimoglu *et al.*, 1996). Ebenso konnte gezeigt werden, dass das *atp*-Operon in eine einzelne, polycistronische mRNA transkribiert wird (Jones *et al.*, 1983). Die Reihenfolge der Gene im *atp*-Operon ist in Abb. 1 zu sehen.

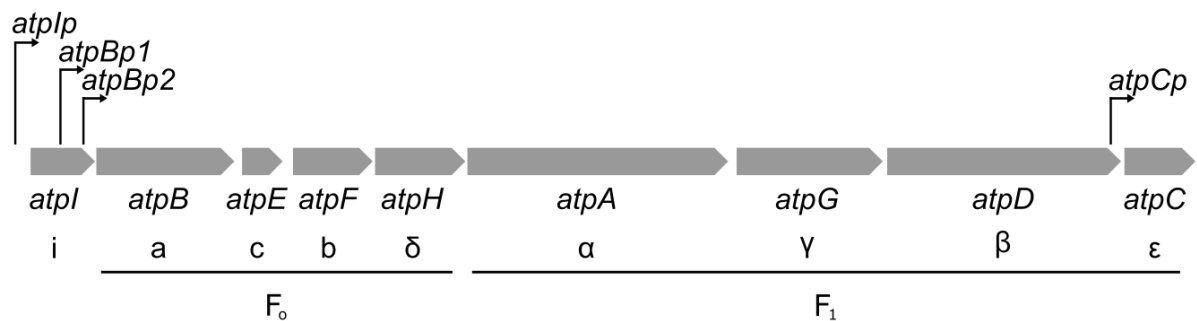


Abb. 1: Das *atp*-Operon von *E. coli*.

Die grauen Pfeile deuten die Länge der Gene im Verhältnis zueinander an. Die Positionen der nachgewiesenen und postulierten Promotoren sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Unter der Bezeichnung der Gene ist auch die der Proteine angegeben, für die sie kodieren. (Abb. erstellt nach Huerta und Collado-Vides, 2003; Jones *et al.*, 1983; McCarthy, 1988; Nielsen *et al.*, 1984; Walker *et al.*, 1984a; Walker *et al.*, 1984b)

Innerhalb der kodierenden Sequenz von *atpI* wurden zwei weitere Promotoren entdeckt, deren Transkriptionsstarts jeweils 171 bp und 307 bp stromabwärts der ersten Base von *atpI* liegen (Nielsen *et al.*, 1984; Abb. 2). Ihre Aktivitäten sind niedriger als die des ersten Promotors (Von Meyenburg *et al.*, 1982; Porter *et al.*, 1983). Die genaue Lage der Promotoren ist in Abb. 2 dargestellt. Da *atpB* ausgehend von *atpBp1* und *atpBp2* im Vergleich zum Start bei *atpIp* um ein Vielfaches schwächer exprimiert wird, wurde die Existenz der zusätzlichen

1 Einleitung

Promotoren kontrovers diskutiert. Jones *et al.* (1983) können keine Aktivität für diese Promotoren messen und auch Kasimoglu *et al.* (1996) zweifeln an ihrer Existenz.

Durch Computer gestützte Analysen auf der Suche nach noch unbekanntem σ^{70} -abhängigen Promotoren wurde ein vierter Promotor vor *atpC* postuliert (Huerta und Collado-Vides, 2003), bisher aber nicht experimentell bestätigt. Seine Position ist neben den anderen Promotoren in Abb. 1 zu sehen.

```
71      CAAGTGGATTGCTGTTTCAGCCTCAAAGACCCCTTCTGGGGCGTCTCTGCAATAAGCGGGG      130
131     GCCTGGCAGTCTTTCTGCCTAACGTTTTGTTTATGATATTTGCTGGCGTCACCAGGCGC      190
           -35                               -10      +1
191     ATACACCAGCGAAAGGCCGGGTGGCCTGGACATTCGCATTTGGCGAAGCTTTCAAAGTTC      250
251     TGGCGATGTTGGTGTACTGGTGGTGGCGTTGGCGGTTTTAAAGCGGTATTCTTGCCGC      310
           -35I      -35II                               -10      +1
311     TGATCGTTACGTGGGTTTTGGTGCTGGTGGTTCAGATACTGGCACCGGCTGTAATTAACA      370
```

Abb. 2: Ausschnitt der Sequenz von *atpI_{Eco}* mit der Lokalisierung der Promotoren *atpBp_{1Eco}* und *atpBp_{2Eco}*.

Die DNA-Sequenz ist in 5'-3'-Richtung angegeben. Die mutmaßliche -35 und -10 Region sowie der Transkriptionsstart bei +1 sind unterstrichen und beschriftet. Die den Promotoren folgenden vorhergesagten RNase E-Schnittstellen sind rot umrandet und die zueinander komplementären Basen, welche die Stamm-Schleifen-Strukturen formen, rot hervorgehoben. Die Zahlen rechts und links von der Sequenz geben den Abstand zum Startcodon von *atpI_{Eco}* an. (nach Nielsen *et al.*, 1984; Jones *et al.*, 1983; Von Meyenburg *et al.*, 1982)

1.2 Die post-transkriptionale Regulation des *atp*-Operons

Brusilow *et al.*, (1982) zeigten, dass die einzelnen Untereinheiten der F_1F_0 -ATPase *in vivo* und *in vitro* in einer festgelegten Stöchiometrie synthetisiert werden. Die Synthese unterschiedlicher Mengen an Proteinen kann über die Regulation ihrer Transkription (McCarthy, 1990) und den mRNA-Abbau (Deutscher, 2006; Jain, 2002; Kushner, 2002) erreicht werden. Da jedoch alle Gene im *atp*-Operon von *E. coli* in eine einzelne mRNA transkribiert werden, stellte sich die Frage, wie die korrekte Stöchiometrie der F_1F_0 -ATPase-Untereinheiten gewährleistet wird.

Nach der Transkription des *atp*-Operon wird die mRNA in verschieden große Teilstücke prozessiert, die unterschiedlich stabil sind (Schaefer *et al.*, 1989; Schramm *et al.*, 1996). Die geringste mRNA-Stabilität weisen *atpI* und *atpB* auf (Lagoni *et al.*, 1993; McCarthy *et al.*, 1991), die höchste *atpE* (Schramm *et al.*, 1996). Als Ursache für die Instabilität der *atpI* und *atpB* mRNA wurden zunächst RNase E-Schnittstellen angeführt (McCarthy *et al.*, 1991;

1 Einleitung

Schaefer *et al.*, 1989). Die RNase E schneidet mRNA innerhalb AT-reicher Regionen. Auf die Schnittstelle folgende Stamm-Schleifen-Strukturen können die Effektivität der RNase E beeinflussen (Kaberdin *et al.*, 2000; Mackie, 2013). Die potentiellen Stamm-Schleifen-Strukturen und RNase E-Schnittstellen sind in Abb. 2 rot hervorgehoben. Spätere Untersuchungen zeigten, dass RNase E mehrere Schnittstellen im gesamten *atp*-Operon besitzt, darunter auch in *atpE* und *atpC* (Gross, 1991; Patel und Dunn, 1995; Patel und Dunn, 1992).

Weitere Experimente ergaben, dass es Unterschiede in der Effizienz der Translation-Initiation gibt. Die Ribosomenbindestelle von *atpA* ist effektiver als die von *atpB*, *atpH* und *atpG* (Angov und Brusilow, 1988; Gerstel und McCarthy, 1989). Durch Verkürzen der Sequenz stromaufwärts von *atpE* identifizierten McCarthy *et al.* (1985) eine vor der Shine-Dalgarno-Sequenz liegende Verstärker-Region, die eine erhöhte Translation ermöglicht. Weiterhin scheint die Translation einiger Untereinheiten gekoppelt zu sein, wie die von *atpH* und *atpA* (Gerstel und McCarthy, 1989), *atpE* und *atpF* (McCarthy *et al.*, 1985) und *atpF* und *atpH* (Pati *et al.*, 1992). Außerdem wird vermutet, dass in der Region zwischen *atpE* und *atpF* (Brusilow *et al.*, 1982; Klionsky *et al.*, 1986) sowie *atpF* und *atpH* RNA-Sekundärstrukturen die Translationsinitiation beeinflussen (Pati *et al.*, 1992).

Die Stöchiometrie wird demnach durch mehrere Faktoren beeinflusst, zu denen unterschiedlich effiziente Translation-Initiationsregionen, die Ausbildung von mRNA-Sekundärstrukturen und die mRNA-Stabilität gehören (McCarthy, 1988; McCarthy und Bokelmann, 1988; Pati *et al.*, 1992; Schramm *et al.*, 1996).

1.3 Bau und Funktion der F₁F₀-ATPase

Die Proteine, für die das *atp*-Operon kodiert, wurden unabhängig von den Genen benannt und erhielten die Namen i, a, c, b, δ , α , γ , β und ϵ (Brusilow *et al.*, 1983; Walker *et al.*, 1984b). Entsprechend der Stöchiometrie in *E. coli* besteht die F₁F₀-ATPase aus $ab_2c_{10}\gamma\epsilon\delta\alpha_3\beta_3$ (Ballhausen *et al.*, 2009; Foster und Fillingame, 1982; Jiang *et al.*, 2001; Lünsdorf *et al.*, 1984). Die Zuordnung der Proteine zu ihren Genen erfolgte mit Hilfe von Studien mit Mutanten sowie *in vitro* Transkription/Translation-Systemen (Abb. 1; Downie *et al.*, 1980; Downie *et al.*, 1981; Fayle *et al.*, 1978; Saraste *et al.*, 1981; Gunsalus *et al.*, 1982; Kanazawa *et al.*, 1978; Mabuchi *et al.*, 1981; Downie *et al.*, 1979; Senior *et al.*, 1979; Senior *et al.*, 1979). Um die Zuordnung der Proteine zu ihren Genen beim Lesen dieser Arbeit zu erleichtern, werden die Proteine im Folgenden entsprechend ihrer Gene als AtpIBEFHAGDC bezeichnet.

1 Einleitung

Die F_1F_0 -ATPase ist in einen membranständigen F_0 -Teil, zusammengesetzt aus AtpB, AtpE₁₀ und AtpF₂, und einen im Zytoplasma lokalisierten F_1 -Teil aus AtpH, AtpA₃, AtpG, AtpD₃ und AtpC untergliedert (Abb. 3 A; Gogol *et al.*, 1987; Walker *et al.*, 1985). Diese dienen als zwei durch einen Stator und eine Spindel verbundene Motoren, die den Protonentransport mit der Synthese bzw. Hydrolyse von ATP koppeln (Capaldi und Aggeler, 2002). Sowohl der F_0 - als auch der F_1 -Komplex sind ohne den anderen funktionsfähig (Dunn und Futai, 1980; Schneider und Altendorf, 1984; Steffens *et al.*, 1987).

1.3.1 Bau und Funktion eines mit Protonen getriebenen Motors

Der membranständige Motor des F_0 -Komplexes, durch den der Protonentransport stattfindet, setzt sich aus AtpB und einem Ring aus AtpE zusammen (Abb. 3 C; Fillingame *et al.*, 2002). Die Anzahl der AtpE-Monomere im Enzym ist von Organismus zu Organismus unterschiedlich. Es werden Ringe mit 9 bis 14 Untereinheiten beschrieben (Ballhausen *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2001; Matthies *et al.*, 2009; Meier *et al.*, 2005; Seelert *et al.*, 2000; Stahlberg *et al.*, 2001; Stock *et al.*, 1999). AtpE ist aus zwei die Membran durchspannenden α -Helices und einer im Zytoplasma lokalisierten Schleife aufgebaut (Fillingame *et al.*, 1991; Girvin *et al.*, 1998). Im Ring sind sie so angeordnet, dass die Transmembranhelix 1 (TMH 1) im Inneren liegt und TMH 2 außen (Dmitriev *et al.*, 1999; Jiang und Fillingame, 1998; Jones *et al.*, 1998).

Zwischen den AtpE-Monomeren wird eine Protonenbindetasche gebildet, deren zentraler Bestandteil in *E. coli* aus Aspartat-61 in der Mitte von Helix 2 besteht, das im aktiven Enzym protoniert und deprotoniert wird (Miller *et al.*, 1990). Der Protonenkanal wird von AtpE und dem in der Membran verankerten AtpB gebildet (Angevine und Fillingame, 2003; Angevine *et al.*, 2003; Long *et al.*, 1998; Wada *et al.*, 1999; Valiyaveetil und Fillingame, 1998). In Helix 4 von AtpB befindet sich die konservierte Aminosäure Arginin-210, die, wenn sie gegenüber von Helix 2 von AtpE liegt (Jiang and Fillingame, 1998), eine wichtige Rolle bei der Protonierung und Deprotonierung von Aspartat-61 spielt (Fillingame *et al.*, 2002; Hatch *et al.*, 1995; Langemeyer und Engelbrecht, 2007; Valiyaveetil und Fillingame, 1998; Valiyaveetil und Fillingame, 1997). Die Protonierung und Deprotonierung von Arg-61 gewährleistet die Rotation des AtpE-Rings (Abb. 3 C; Fillingame *et al.*, 2002). In Abb. 3 B ist der Motor schematisch dargestellt.

1.3.2 Der katalytisch aktive Teil der F_1F_0 -ATPase

Der zweite Motor der F_1F_0 -ATPase ist im Zytoplasma lokalisiert und besteht aus AtpA₃ und AtpD₃, die hexagonal im Wechsel angeordnet sind. Die katalytisch aktiven Zentren befinden

1 Einleitung

sich in AtpD. Durch die während der Rotation im AtpA₃D₃-Kopf ausgelösten Konformationsänderungen erfolgt die ATP-Synthese aus ADP und P_i (Abb. 3 A; Abrahams *et al.*, 1994; Masaike *et al.*, 2002; Scanlon *et al.*, 2007). In jedem der drei katalytischen Zentren findet zum gleichen Zeitpunkt eine andere Reaktion statt (Nishizaka *et al.*, 2004). Abhängig davon in welche Richtung die Reaktion verläuft, werden ADP und P_i gebunden / entlassen, sowie ATP synthetisiert / hydrolysiert oder entlassen / gebunden. Beobachtungen in Echtzeit ergaben eine Bewegung in 120°-Schritten, die durch die Hydrolyse eines ATP ermöglicht wurde (Adachi *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 1998). Die Bewegung ließ sich weiter in einen 80° und einen 40°-Schritt auflösen. Während der 80°-Rotation wird ATP gebunden (Yasuda *et al.*, 2001), ATP hydrolysiert (Shimabukuro *et al.*, 2003) oder ADP und P_i entlassen, wobei das Entlassen des P_i den letzten 40°-Schritt antreibt (Adachi *et al.*, 2007). Damit wird ATP bei 0° gebunden und nach einer Rotation von 240° als ADP entlassen (Adachi *et al.*, 2007). Man geht davon aus, dass dieselben Prinzipien bei der umgekehrten Reaktion gelten.

1.3.3 Der Stator und die Spindel der F₁F₀-ATPase

Um die Bewegung des AtpE-Rings auf den Motor des F₁-Komplexes zu übertragen, besitzt das Enzym einen Stator und eine Spindel. Der Stator wird von einem AtpF-Dimer, das zum F₀-Teil gezählt wird (Hermolin *et al.*, 1983; Rodgers *et al.*, 1997; Sorgen *et al.*, 1998) und AtpH, das zum F₁-Komplex gehört (Wilkins und Capaldi, 1998), gebildet. Die α -Helices am N-Terminus von AtpF interagieren hierbei mit der Außenseite des AtpE-Rings (Birkenhäger *et al.*, 1995; Dmitriev *et al.*, 1999; Takeyasu *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1996). Eines der AtpF-Monomere interagiert ebenso mit AtpB (Brandt *et al.*, 2013a), während der C-terminale Teil des AtpF-Dimers im Zytoplasma mit dem AtpA₃D₃-Kopf und AtpH interagiert (Brandt *et al.*, 2013a; Dunn, 1992; Rodgers *et al.*, 1997; Rodgers und Capaldi, 1998). AtpF spielt eine entscheidende Rolle für den Zusammenhalt der F₁F₀-ATPase (Steffens *et al.*, 1987; Gajadeera und Weber, 2013) und eine Studie von Kersten *et al.* gibt Hinweise darauf, dass AtpF die Konformation der Nukleotid-Bindestellen beeinflusst und so auch auf die Aktivität des Enzyms einwirkt (Kersten *et al.*, 2000).

Die Drehung des AtpE-Rings wird durch die Spindel aus AtpG und AtpC übertragen (Stock *et al.*, 1999; Watt *et al.*, 2010). Eine α -Helix von AtpG wird komplett von dem Kopf aus AtpA und AtpD umschlossen (Abrahams *et al.*, 1994). Wenn AtpG rotiert (Abrahams *et al.*, 1994; Kinoshita *et al.*, 2000; Kinoshita *et al.*, 2004; Noji *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2001), bestimmt die Untereinheit mit seiner Position welche Reaktion in jedem der drei katalytisch aktiven

1 Einleitung

Zentren stattfindet (Kinosita *et al.*, 2004). Dabei kann die mechanische Energie mit der sich AtpG bewegt über die Synthese von ATP in chemische Energie umgewandelt werden (Itoh *et al.*, 2004; Okazaki und Hummer, 2015). Während der Hydrolyse von ATP rotiert AtpG angetrieben durch die Konformationsänderungen innerhalb von AtpB (Adachi *et al.*, 2007; Noji *et al.*, 1997). AtpC rotiert dabei ebenfalls und überträgt die Bewegung zusammen mit AtpG auf den AtpE-Ring (Aggeler *et al.*, 1997; Kato-Yamada *et al.*, 1998), was zu einem Transport von Protonen aus der Zelle führt (Walker, 2012).

1.3.4 Die besondere Funktion von AtpC

AtpC ist aus einem N-terminalen β -Faltblatt aufgebaut, welches über eine Schleife mit antiparallel angeordneten C-terminalen α -Helices verbunden ist (Uhlin *et al.*, 1997; Wilkens *et al.*, 1995). Die Schleifenregion von AtpE interagiert mit AtpC (Hermolin *et al.*, 1999; Zhang und Fillingame, 1995), was die Annahme stützt, dass AtpC eine Rolle bei der Kopplung von Protonentransport und ATP-Synthese/Hydrolyse spielt (Zhang *et al.*, 1994). AtpC reguliert die Aktivität des Komplexes (Kato *et al.*, 1997; Kato-Yamada *et al.*, 1999) und kann hierzu zwei verschiedene Konformationen einnehmen: Ist sie gestreckt, kommen die α -Helices in Kontakt mit AtpD (Bulygin *et al.*, 2004; Hara *et al.*, 2001) und inhibieren die ATPase-Aktivität (Hara *et al.*, 2001; Konno *et al.*, 2011), indem sie die Rotation von AtpG einschränken (Iino *et al.*, 2009). Eine Bindung von ATP an AtpC hingegen stabilisiert dessen kompakte Form, die eine ATPase-Aktivität zulässt (Kato *et al.*, 2007; Yagi *et al.*, 2007) und damit vermutlich die Kopplung von Protonentransport und ATP-Hydrolyse ermöglicht (Kadoya *et al.*, 2011). Die α -Helices liegen in dieser Konformation dicht beieinander (Abb. 3 B; Bulygin *et al.*, 2004; Hara *et al.*, 2001).

Die Regulierung der F_1F_0 -ATPase über AtpC scheint in mehreren Schritten abzulaufen. Zunächst bindet ATP an die AtpD Untereinheit. Dies bewirkt eine Änderung der Konformation in AtpC und ermöglicht damit die Bindung von ATP an AtpC (Kato *et al.*, 2007).

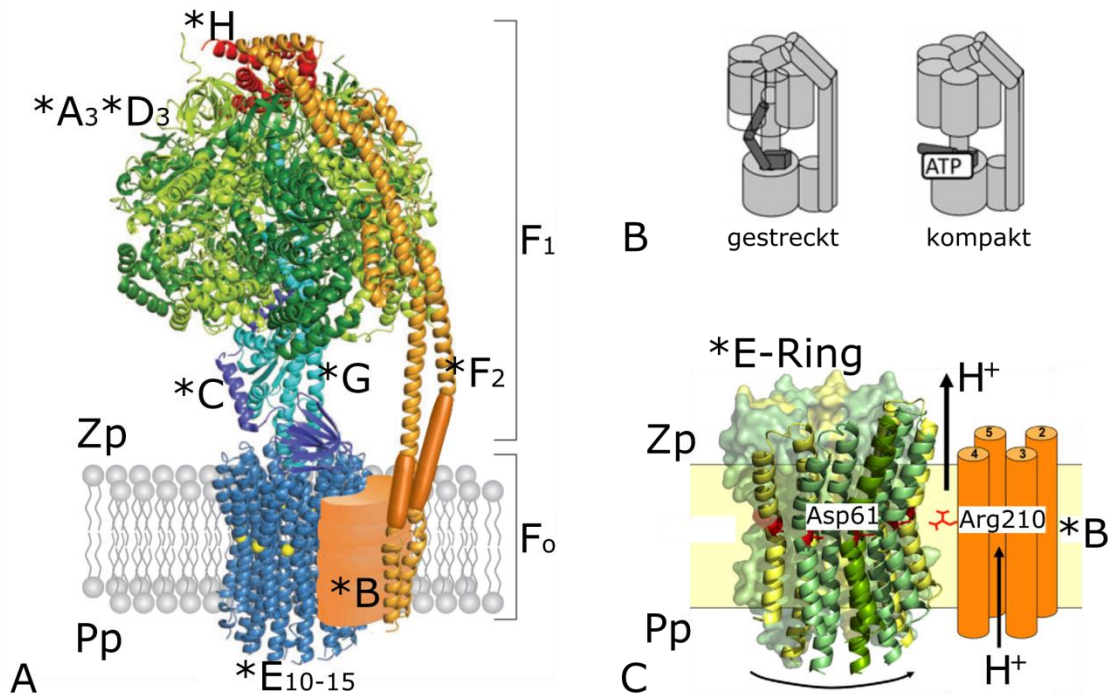


Abb. 3: Der Bau der F_1F_0 -ATPase.

(A) Die F_1F_0 -ATPase setzt sich aus dem membranständigen F_0 -Teil (*B=hellorange, *E=blau, *F=orange) und dem ins Zytoplasma ragenden F_1 -Komplex (bestehend aus *A=hellgrün, *D=grün, *G=hellblau, *C=lila und *H=rot) zusammen (Abb. verändert nach von Ballmoos *et al.*, 2009). (B) Modell der gestreckten inhibierenden sowie kompakten aktivierenden Konformation von AtpC (dunkelgrau) als Teil der F_1F_0 -ATPase (grau). Die kompakte Form wird durch die Bindung von ATP stabilisiert (Abb. verändert nach Kadoya *et al.*, 2011). (C) Der Motor des F_0 -Teils wird von AtpB (orange) und dem AtpE-Ring (grün bis gelb) geformt. Sie bilden den aus 2 Halbkanälen zusammengesetzten Protonenkanal. Die Transmembranhelices (TMHs) von AtpB bilden den Zugang durch den die Protonen Aspartat 61 (Asp61, rot) von AtpE erreichen können. Durch Protonierung und Deprotonierung dieser Aminosäure wird die Drehung des AtpE-Rings gegenüber der stationären AtpB Untereinheit ermöglicht. Arginin 210 (Arg210, rot) von AtpB spielt eine wichtige Rolle bei der Deprotonierung von Asp61 (Abb. verändert nach Fillingame und Steed, 2014). Zp Zytoplasma, Pp Periplasma, *Atp

1.4 Der Zusammenbau des Enzymkomplexes

Deletionsmutanten im *atp*-Operon beeinflussen das Wachstum unterschiedlich stark, was die Frage nach der Abfolge des Zusammenbaus der F_1F_0 -ATPase aufwarf (Klionsky *et al.*, 1984). Brockmann *et al.* (2013) und Hilbers *et al.* (2013) untersuchten die Reihenfolge des Zusammenbaus mit Hilfe eines zeitverzögerten Expressionssystems. Demnach setzen sich in *E. coli* zunächst der AtpE-Ring sowie das AtpF-Dimer im Zytoplasma zusammen und integrieren unabhängig voneinander in die Membran (Hilbers *et al.*, 2013; Sorgen *et al.*, 1998). Die Integration des AtpE-Rings erfolgt mit Hilfe der YidC Insertase (Van der Laan *et al.*, 2004; Kol *et al.*, 2006). AtpF₂ sowie auch AtpB werden hingegen über die Sec-Translokase inseriert. YidC unterstützt auch diesen Prozess und Ffh dient als *signal*

recognition particle der Erkennung der Proteine (Yi *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2004). Die stabile Integration von AtpB erfordert die Anwesenheit AtpF und AtpE (Hermolin und Fillingame, 1995; Hilbers *et al.*, 2013). In der Membran bilden zunächst AtpB und AtpF₂ einen Komplex (Hilbers *et al.*, 2013).

Gleichzeitig bildet sich im Zytoplasma der AtpA₃D₃-Kopf des F₁-Teils. Dieser interagiert mit einem Komplex aus AtpG und AtpC und lagert sich mit diesem an den AtpE-Ring an. AtpH interagiert mit AtpF sowie dem AtpA₃D₃-Kopf und schließt den Zusammenbau der F₁F_o-ATPase ab (Deckers-Hebestreit, 2013; Hilbers *et al.*, 2013).

1.5 Welche Rolle spielt AtpI?

Das erste Gen im *atp*-Operon von *E. coli*, *atpI*, kodiert für ein etwa 13,5 kDa schweres Membranprotein (Brusilow *et al.*, 1983; Schneppe *et al.*, 1990; Schneppe *et al.*, 1991), dessen Struktur mit vier Membrandomänen vorhergesagt wird (Walker *et al.*, 1984b). Zum AtpI Gehalt in der Zelle gibt es widersprüchliche Ergebnisse. In Minizellen konnte es in der gleichen Menge wie die F₁F_o-ATPase detektiert werden (Brusilow *et al.*, 1983), Solomon *et al.* (1989) ermittelten jedoch eine 10-20fach geringere Expression von *atpI*'-lacZ im Vergleich zu *atpB*'-lacZ in *E. coli* MC1000Δ(*atpI*-*atpC*).

Auf der Suche nach der Funktion von *atpI* wurden verschiedene *E. coli* Mutanten hergestellt und charakterisiert. Eine Tn10-Insertion innerhalb von *atpI* führte zu einem verringerten Wachstum in Glukose-haltigem Medium. Dieses Ergebnis beruhte jedoch auf polaren Effekten der Insertion (Von Meyenburg *et al.*, 1982). Der von Gay (1984) beobachtete geringere Wachstumsertrag eines *atpI* Deletionsstammes gegenüber dem Wildtyp konnte ebenfalls nicht bestätigt werden (Jensen und Michelsen, 1992). Hsu und Brusilow (1995) postulierten einen Einfluss von *atpI* auf die Transkription und Synthese von *atpB*. Der Effekt beruhte aber nicht auf der Abwesenheit von AtpI, sondern Teilen der *atpI* mRNA (Hsu und Brusilow, 1995). Ebenso wurde postuliert, dass AtpI von *Bacillus pseudofirmus* OF4 ein Mg²⁺-Transporter sei (Hicks *et al.*, 2003). Später nahmen die Autoren aber Abstand von der These (Liu *et al.*, 2013).

Bis heute ist die Funktion von AtpI nicht geklärt. Gay und Walker (1981a) stellten die These auf, dass es sich um ein „Pilotprotein“ handelt, welches den Zusammenbau der F₁F_o-ATPase unterstützt. In einigen Organismen wird diese Theorie durch experimentelle Daten gestützt. Für die Na⁺-abhängigen F₁F_o-ATPasen von *Propionigenium modestum* und *Acetobacterium*

woodii wurde gezeigt, dass die Zusammensetzung des AtpE-Rings nur in Anwesenheit von AtpI erfolgt (Brandt *et al.*, 2013b; Ozaki *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2007). Für H⁺-abhängige F₁F_o-ATPasen konnte dies bisher nicht gezeigt werden. In *Bacillus pseudofirmus* OF4 wird AtpI nicht für die Zusammensetzung des AtpE-Rings benötigt, stabilisiert aber den Rotor des F_o-Teils und dessen Bindung an den F₁-Komplex (Liu *et al.*, 2013).

In *E. coli* ist *atpI* nicht essentiell (Gay, 1984; Von Meyenburg *et al.*, 1982; Walker *et al.*, 1984b). Der Zusammenbau des AtpE-Rings sowie die Integration des F_o-Komplexes erfolgen unabhängig von AtpI (Decker *et al.*, 1982; Gay, 1984; Van der Laan *et al.*, 2004). Aber obwohl AtpI in *E. coli* kein Bestandteil der F₁F_o-ATPase zu sein scheint (Brusilow *et al.*, 1981; Foster *et al.*, 1980), gibt es Hinweise darauf, dass es mit dem F_o-Komplex interagiert (Matthies *et al.*, 2011; Schneider und Altendorf, 1982; Schneppe *et al.*, 1991).

1.6 Fragestellungen

Aus den bisherigen Erkenntnissen über die F₁F_o-ATPase und *atpI* ergibt sich eine Reihe von Fragestellungen, die Gegenstand dieser Arbeit sind. Ein Großteil der Experimente wurde mit dem Gram-negativen γ -Proteobacteria *E. coli* durchgeführt, dessen Genom und verwandtschaftliche Beziehungen gut untersucht sind (Lukjancenko *et al.*, 2010). Das Bakterium diente als Modellorganismus für die Erforschung der Atmungskette (Ingledew und Poole, 1984) und speziell auch der F₁F_o-ATPase (Deckers-Hebestreit, 2013; Walker, 2012).

Die Regulation der Transkription und Translation eines Promotors kann Aufschluss über dessen Funktion liefern. In *E. coli* gelangten Experimentatoren jedoch zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der Promotoren innerhalb der kodierenden Sequenz von *atpI_{Eco}* und die Verwendung unterschiedlicher Systeme erschwert den Vergleich der Resultate (Jones *et al.*, 1983; Kasimoglu *et al.*, 1996; Von Meyenburg *et al.*, 1982; Porter *et al.*, 1983). Aus diesem Grund sollten die Aktivitäten der Promotoren des *atp_{Eco}*-Operons noch einmal untersucht werden, einschließlich der des nicht experimentell bestätigten Promotors vor *atpC_{Eco}*.

Bei *Cupriavidus metallidurans* handelt es sich um ein Gram-negatives Bakterium der β -Proteobacteria (Goris *et al.*, 2001), das in den Abwassertanks einer Zinkfabrik in Belgien entdeckt wurde (Mergeay *et al.*, 1978). Aufgrund seiner hohen Schwermetallresistenz dient es als Modellorganismus für die Untersuchung von Resistenzmechanismen gegenüber verschiedenen Metallen (Diels *et al.*, 2009; Jarosławiecka und Piotrowska-Seget, 2014; Mergeay *et al.*, 1985; von Rozycki und Nies, 2009; Wiesemann *et al.*, 2013). Für die

1 Einleitung

vorliegende Arbeit war der Organismus interessant, weil er einen langen intergenischen Bereich zwischen *atpI* (*Virtual Institute of Microbial Stress and Survival* [VIMSS]1775891) und *atpB* aufweist (VIMSS1775890). Wenn die Transkription und Translation von *atpI* unabhängig vom *atp*-Operon reguliert wird, könnte dies Hinweise auf die Funktion von *atpI* liefern. Dazu sollte zunächst untersucht werden, ob *atpI_{Cmet}* zum *atp_{Cmet}*-Operon gehört und ob ein zusätzlicher Promotor vor *atpB_{Cmet}* existiert.

Eine weitere Besonderheit von *atpI_{Cmet}* (VIMSS1775891) gegenüber *atpI_{Eco}* (VIMSS17799) ist dessen zusätzliche C-terminale Domäne. Um diese zu bestätigen sollte geprüft werden, ob der Start von *AtpI_{Cmet}* korrekt annotiert ist.

Die Beziehung von *AtpI_{Eco}* zur F_1F_0 -ATPase, vor allem zu den membranständigen Komponenten, soll mittels Protein-Protein-Interaktionsstudien *in vivo* und gegebenenfalls auch *in vitro* geprüft werden. Hierzu ist die experimentelle Bestätigung der Lokalisation des N- und C-Terminus von *AtpI_{Eco}* notwendig.

Bisher konnte kein Phänotyp für die Deletion von *atpI_{Eco}* identifiziert werden. Daher sollte in dieser Arbeit das Wachstum eines *atpI_{Eco}* Deletionsstammes unter pH-Stress betrachtet werden, um neue Erkenntnisse über die Funktion von *atpI_{Eco}* zu gewinnen.

2 Materialien und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien stammten, sofern nicht anders ausgewiesen, von Carl Roth GmbH und Co.KG, Sigma-Aldrich Inc., Roche Diagnostics und New England BioLabs Inc..

2.1 Anzucht der Mikroorganismen

Die Anzucht aller Stämme von *E. coli* und *C. metallidurans* (Tab. 1) erfolgte aerob in zuvor autoklavierten beziehungsweise sterilfiltrierten Medien.

Tab. 1: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Stämme

Name	wichtige Charakteristika	Herkunft
<i>Cupriavidus metallidurans</i>		
CH34	pMOL28, pMOL30	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
AE104	plasmidfrei	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
<i>Escherichia coli</i>		
BL21 (DE3)	<i>F</i> -, <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B(r_B- m_B-)</i> , λ (DE3), pLysS (cm ^R)	Stratagene GmbH, Heidelberg
BTH101	<i>F</i> -, <i>cya</i> -99, <i>araD</i> 139, <i>galE</i> 15, <i>galK</i> 16, <i>rpsL</i> 1 (Str ^r), <i>hsdR</i> 2, <i>mcrA</i> 1, <i>mcrB</i> 1	Battesti und Bouveret, 2012
BW25113	<i>rrnB3</i> Δ <i>lacZ</i> 4787 <i>hsdR</i> 514 Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ (<i>rhaBAD</i>)568 <i>rph</i> -1	Datsenko und Wanner, 2000
CC118	<i>araD</i> 139, (<i>ara-leu</i>)7697, <i>lacX</i> 74, <i>recA</i> 1, <i>rpsE</i> , <i>phoA</i> 20, <i>galE</i> 15, <i>galK</i> 16, <i>thi</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am)	Manoil und Beckwith, 1985
DH5 α	<i>fhuA</i> 2 <i>lac</i> (<i>del</i>)U169 <i>phoA</i> <i>glnV</i> 44 Φ 80' <i>lacZ</i> (<i>del</i>)M15 <i>gyrA</i> 96 <i>recA</i> 1 <i>relA</i> 1 <i>endA</i> 1 <i>thi</i> -1 <i>hsdR</i> 17	Meselson und Yuan, 1968
ECB174	BW25113 Derivat, <i>glmS</i> :: <i>atpIp-atpI</i> '-' <i>strep-egfp aacC1</i>	diese Arbeit; hergestellt nach Choi und Schweizer, 2006
ECB175	BW25113 Derivat, <i>glmS</i> :: <i>atpIp-atpI</i> '-' <i>strep-egfp</i> '-' <i>atpI aacC1</i>	diese Arbeit; hergestellt nach Choi und Schweizer, 2006
ECB176	BW25113 Derivat, <i>glmS</i> :: <i>atpIp-atpI</i> '-' <i>strep-egfp</i> '-' <i>atpI-atpB</i> '-' <i>mcherry aacC1</i>	diese Arbeit; hergestellt nach Choi und Schweizer, 2006
ECB178	BW25113 Derivat, Δ <i>atpI</i>	Stammsammlung AG Nies
ECB179	ECB178 Derivat, <i>glmS</i> :: <i>atpIp-atpI</i>	diese Arbeit; hergestellt nach Choi und Schweizer, 2006
S17-I	<i>pro</i> , Tra ⁺ <i>recA</i>	Simon, 1984
W3110	<i>F</i> λ <i>rph</i> -1 INV(<i>rrnD</i> , <i>rrnE</i>)	Mosteller und Goldstein, 1975

2.1.1 Anzucht von *C. metallidurans* und das Messen von Wachstumskurven

C. metallidurans wurde in Tris-Minimalmedium mit Natrium-Gluconat (TMM_{NaGluc}; 1x Komponente A, 1x Komponente B, 9,17 mM Na-Gluconat [Sigma-Aldrich]; siehe Tab. 2) angezogen. Die Einstellung des pH-Wertes, kontrolliert durch das pH-Meter 761 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte GmbH und Co.KG, Berlin), erfolgte durch Zugabe von HCl zu Komponente A. Gegebenenfalls wurden Antibiotika zum Flüssig- oder Festmedium hinzugefügt (Tab. 3). Zur Stammhaltung wurde *C. metallidurans* von einer Flüssigkultur auf eine TMM_{NaGluc}-Platte (TMM_{NaGluc}, 2 % [w/v] Difco Bacto-Agar) ausgestrichen. Die Platten inkubierten mindestens 2 Tage bei 30 °C und lagerten maximal 3 Wochen bei 4 °C.

Tab. 2: Zusammensetzung der Einzelkomponenten des TMM-Mediums

20x Komponente A		10x Spurenelementlösung (nach Pfennig, 1974)		20x Komponente B	
121 g	Tris-HCl, pH 7,0	0,1 g	ZnSO ₄ *7 H ₂ O	8,59 g	NaSO ₄
93,6 g	NaCl	0,03 g	MnCl ₂ *4 H ₂ O	2,29 g	Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O
29,8 g	KCl	0,3 g	H ₃ BO ₃		
21,4 g	NH ₄ Cl	0,2 g	CoCl ₂ *6 H ₂ O		
4 g	MgCl ₂ *6 H ₂ O	0,01 g	CuCl ₂ *2 H ₂ O		
0,6 g	CaCl ₂ *2 H ₂ O	0,188 g	NiCl ₂ *6 H ₂ O		
0,024 g	FeNH ₄ -Citrat	0,03 g	Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O		
2 ml	10x Spurenelementlösung				
ad 1 l H ₂ O _{dd}		ad 1 l H ₂ O _{dd}		ad 1 l H ₂ O _{dd}	

Von den bewachsenen Platten wurde eine Vorkultur in 4 ml TMM_{NaGluc} angesetzt und über Nacht bis zum Erreichen der frühen stationären Phase bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler (HI, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) geschüttelt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Kulturen immer mit 200 rpm bei 30°C geschüttelt. Damit wurde die zweite Vorkultur 1:20 angeimpft und für 24 h geschüttelt. Die Hauptkultur wurde auf die optische Dichte, gemessen bei λ=600 nm, (OD₆₀₀) 0,05 eingestellt und ebenfalls bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Das Messen der OD₆₀₀ erfolgte im Spektrometer SmartSpec™3000 (BIORAD, München). Die mittlere exponentielle Phase wurde etwa nach 16 h erreicht. Für die Wachstumskurven wurde die OD₆₀₀ der Hauptkultur stündlich ab 16 h nach Animpfen gemessen.

2.1.2 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Vollmedium (Difco LB Broth, Lennox, BD), M9-Minimalmedium (0,1 % Ammoniumchlorid, 50 mM Na-Phosphatpuffer, 50 mM Glukose, 22 mM KCl, 40 mg/ml L-Prolin, 0,1 % [w/v] Casaminosäuren, 1 mM MgSO₄, 1 mg/l Thiamin, 0,1 mM CaCl₂, 0,5 µM FeCl₂, jeweils frisch hergestellt) oder TMM (mit 3 g/l Casaminosäuren und 50 mM Glukose, Natrium-Succinat oder Glycerin), gegebenenfalls mit Antibiotika (Tab. 3). Der pH-Wert des TMM wurde entsprechend mit HCl auf pH 6,0; pH 7,0 oder pH 8,0 eingestellt. Die Casaminosäuren wurden steril filtriert und immer frisch dem Medium zugesetzt. Im M9-Minimalmedium wurde der pH-Wert über den Na-Phosphatpuffer auf pH 5,0; pH 5,5; pH 7,0 oder pH 8,0 mit Hilfe des Mettler Toledo MP220 pH-Meter (Mettler Toledo GmbH, Gießen) eingestellt. Das M9-Minimalmedium wurde jeweils kurz vor dem Gebrauch aus den sterilen Einzelkomponenten hergestellt. L-Prolin, Casaminosäuren, Thiamin und FeCl₂ wurden steril filtriert, der Rest autoklaviert.

Tab. 3: Antibiotikakonzentrationen in Medien für *E. coli* und *C. metallidurans*.

Antibiotika	Lösungsmittel der Stammlösung	Endkonzentration im Medium	
		<i>E. coli</i>	<i>C. metallidurans</i>
Ampicillin	H ₂ O _{dd}	100 mg/l	-
Gentamicin	H ₂ O _{dd}	15 mg/l	-
Kanamycin	H ₂ O _{dd}	50 mg/l	-
Tetracyclin	70 % Ethanol	12,5 mg/l	12,5 mg/l
Streptomycin	H ₂ O _{dd}	100 mg/l	-

Für Vorkulturen wurden die Stämme von einer LB-Agarplatte (Difco™ LB Agar, Lennox, BD) in 4 ml Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 30 °C oder 37 °C auf einem Rundschtüttler (HS500, IKA Labortechnik) inkubiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Kulturen immer mit 200 rpm geschüttelt. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei der gleichen Temperatur geschüttelt. Für das Messen von Wachstumskurven wurde mit der Vorkultur zunächst eine zweite Vorkultur in 4 ml Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und 2 h bei der entsprechenden Temperatur geschüttelt, bevor die Hauptkultur in 96-Well-Platten angeimpft wurde. Die Platten schüttelten im neoLab Shaker DTS-2 (neoLab, Heidelberg) oder Tecan infinite M200 (Tecan Austrai GmbH) bei 1200 rpm. Die OD₆₀₀ wurde in regelmäßigen Abständen im Tecan infinite M200 gemessen. Zur Auswertung wurde die OD₆₀₀ des Anzuchtmediums von den während des Wachstums gemessenen Werten abgezogen und in einem Diagramm

aufgetragen. Zusätzlich wurden die Verdopplungszeiten t_d der Stämme während der exponentiellen Phase mit der Formel

$$t_d = \frac{t_1 - t_0}{\frac{\lg OD(600)_1 - \lg OD(600)_0}{\lg 2}} \text{ berechnet.}$$

2.2 Genetische Arbeiten

Das genetische Material für alle angewandten genetischen Methoden stammte von den Stämmen *C. metallidurans* CH34 und AE104 sowie *E. coli* W3110 oder Plasmiden.

2.2.1 RNA Isolation und DNaseI-Verdau

Für die Isolierung von RNA aus *C. metallidurans* AE104 und CH34 erfolgte die Anzucht in TMM_{NaGluc} wie in Punkt 2.3.1 beschrieben. 7,5 ml der Hauptkultur wurden bei Erreichen von OD₆₀₀ 0,6±0,05 mit 1,5 ml kalter Stopp-Lösung (5 % [v/v] Phenol; 95 % [v/v] Ethanol) gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen tauten auf Eis auf und wurden für 10 min mit 5000 rpm bei 4°C in der Zentrifuge Universal 30 RF (Hettich Lab Technology) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml peqGOLDTriFast™ (peqlab) gelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor das Gemisch zusammen mit 200 µl Chloroform in ein *Phase Lock Gel Heavy* Reaktionsgefäß (PLG Reaktionsgefäß, 5 PRIME) überführt wurde. Das Gemisch wurde kurz geschüttelt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation mit 14000 rpm wurden 0,5 ml der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl Isopropanol vermischt. Um die Fällung der RNA zu gewährleisten, wurde der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 30 min mit 14000 rpm bei 4 °C in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R (Eppendorf AG) zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 Mal mit 500 µl 75 % [v/v] Ethanol gewaschen und je 10 min mit 14000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 87,5 µl DEPC-H₂O gelöst und mit 10 µl 10x DNase I-Puffer (Promega), 2 µl DNase I (Promega) und 0,5 µl RNase Inhibitor (RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Scientific) versetzt. Für den DNA-Verdau wurde der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert und nach erneuter Zugabe von 2 µl DNaseI weitere 30 min. Für die Reinigung der RNA wurde der Ansatz zusammen mit 150 µl Roti®-Aqua-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) in ein PLG Reaktionsgefäß überführt, gemischt und für 15 min mit 14000 rpm bei Raumtemperatur in der Sigma Tischzentrifuge (Laborzentrifugen GmbH) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 450 µl 99,8 % [v/v] Ethanol und 67 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,7) gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach der RNA-Fällung wurde der Ansatz eine halbe

Stunde mit 14000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet wie zuvor 2 Mal mit 75 % [v/v] Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl DEPC-H₂O gelöst. Die RNA lagerte bis zur Verwendung bei -20 °C.

2.2.2 Trennung der RNA über ein Formaldehyd-Agarosegel

Um die Qualität der RNA zu testen, wurde sie über ein Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Dafür wurden 0,5 g Agarose (Peqlab GmbH) in 50 ml 1x MOPS-Puffer (20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 7,0 mit NaOH eingestellt) gekocht bis sich die Agarose löste. Vor dem Gießen des Gels wurden 0,9 ml 37% [v/v] Formaldehyd und ein Tropfen Ethidiumbromid (Tropfflasche, 250 µg/ml) zu dem im Wasserbad auf 60 °C abgekühlten Gemisch hinzugegeben. Währenddessen wurden die RNA-Proben mit 2 Volumen RNA-Denaturierungspuffer (0,7x MOPS-Puffer; 24 % [v/v] 37 % [v/v] Formaldehyd; 69 % [v/v] Formamid) versetzt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Proben wurden sofort auf Eis abgekühlt und 1:6 mit RNA-Ladepuffer (50 % [v/v] Formamid; 3,8x MOPS-Puffer; 6 % [v/v] 37 % [v/v] Formaldehyd; 6 % [v/v] Glycerin; 0,4 mg/ml Bromphenolblau) vermischt. Das beladene Agarosegel lag in einer Laufkammer mit Formaldehyd-Laufpuffer (1x MOPS-Puffer; 2 % [v/v] 37 % [v/v] Formaldehyd) an die eine Spannung von 90 mV (BioRad Power Pac 200, BioRad, München) angelegt wurde. Abschließend wurde das Gel unter UV-Licht im UV-Transilluminator (INTAS UV-Systeme) betrachtet. Alle Schritte mit Formaldehyd und Formamid wurden unter dem Abzug durchgeführt.

2.2.3 Synthese von cDNA

Die für die cDNA-Synthese verwendeten Chemikalien stammten mit Ausnahme des DEPC-H₂O und des spezifischen Primers von Invitrogen™. Zunächst wurde 1 µg RNA mit 1 µl eines spezifischen Primers oder *random* Primer versetzt. Der mit DEPC-H₂O auf 10 µl aufgefüllte Ansatz inkubierte 5 min bei 65 °C und wurde sofort im Anschluss auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl 5x *first strand*-Puffer, 1 µl 0,1 M Dichlordiphenyltrichlorethan (DTT), 0,5 µl 10 mM dNTP-Lösung und 0,5 µl SUPERSCRIPT™II (200 U/µl) inkubierte der Ansatz erst 10 min bei Raumtemperatur und im Anschluss eine Stunde bei 42 °C. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 15 min bei 70 °C. Die erhaltene cDNA diente als *Template* in einer *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

2.2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR) und Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Die PCR wurde im T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Als *Template* diente chromosomale DNA oder Plasmid-DNA und in der RT-PCR cDNA. Für eine Kontroll-PCR wurden Zellen in H₂O_{dd} suspendiert, 10 min bei 95 °C gekocht, zentrifugiert und der Überstand als *Template* verwendet. Der Reaktionsansatz und das Programm für die PCR richteten sich nach dem verwendeten Enzym. Für Kontroll- und RT-PCR wurden 0,5 µl Taq-Polymerase (Roche), 5 µl 10x Puffer 1 (0,5 M Tris-HCl pH 9,2; 0,16 M (NH₄)₂SO₄; 17,5 mM MgCl₂; 1 % [v/v] Tween 20), je 2 µl Primer (10 pmol/µl), 1 µl dNTP-Lösung (10 mM), 1 µl *Template* und 38,5 µl H₂O_{dd} verwendet. Im PCR-Programm erfolgte zunächst ein Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5 min. Darauf folgten 30 Zyklen der Abfolge von 95 °C für 30 s, X °C für 30 s und 72 °C für Y s. Das Programm wurde mit einem 7 min dauernden Schritt bei 72 °C abgeschlossen. Die *Annealing*-Temperatur X richtete sich nach den Primern und wurde mit dem NEB Tm Calculator v1.7.2 berechnet, die Dauer der *Elongation* Y richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, wobei die Taq-Polymerase 1 kb in einer Minute amplifiziert.

Wenn die PCR-Produkte für eine Klonierung weiterverwendet wurden, erfolgte die PCR mit der Q5-Polymerase. Der PCR-Ansatz unterschied sich dahingehend, dass 0,5 µl Q5-Polymerase, 10 µl 5x Q5-Puffer, je 2,5 µl Primer und entsprechend 32,5 µl H₂O_{dd} verwendet wurden. Das PCR-Programm startete bei 98 °C für 2 min, beinhaltete 34 Zyklen der Abfolge 98 °C für 10 s, X °C für 30 s, 72 °C für Y s und endete mit einem Schritt bei 72 °C für 5 min. Die Dauer der *Elongation* richtete sich entsprechend nach der Q5-Polymerase, die 1 kb in 30 s amplifizierte, und der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Alle verwendeten Primer (hergestellt von der Metabion GmbH) sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Die Tabelle setzt sich auf den folgenden Seiten fort.

Name/ Orientierung ¹	Sequenz (in 5'-3'-Richtung) ²	Beschreibung ³
AH1 <i>fw</i>	GATCCGACATCATGCGGCCAGT	RT-PCR-Primer, bindet 229 bp stromaufwärts des Startcodons von <i>atpI_{Cmet}</i>
AH3 <i>fw</i>	TGTTGTTCCCAGTGGCTTCTTTGCG	RT-PCR-Primer, bindet 348 bp stromabwärts des Startcodons von <i>atpI_{Cmet}</i>
AH4 <i>rev</i>	TTGCCGCCGACCGAATTAAAGTTCT	RT-PCR-Primer, bindet 95 bp stromabwärts des Startcodons von <i>atpB_{Cmet}</i>

2 Materialien und Methoden

AH11	<i>fw</i>	CCCCACCGGTTACGCTGGGCCTGTCTGTGC	RT-PCR-Primer, bindet 784 bp stromaufwärts des Startcodons von <i>Rmet 3503</i>
AH23	<i>rev</i>	GGGAATATTTGGCTGCACTAGTGCTCG	Klonierung von <i>gfp+</i> in pBBR1MCS-3, <i>Template</i> pMUTIN-GFP+ (<i>SspI</i> -, <i>SpeI</i> -Schnittstelle)
AH24	<i>fw</i>	CCCCCGCGGCCTGCGCGAACCGCAAGC	Klonierung des Bereiches 400 bp stromaufwärts des <i>atpI_{Cmet}</i> Startcodons in pECD1555/pECD1556 (<i>SacII</i> -Schnittstelle)
AH25	<i>rev</i>	GGGGCTAGCCACCACCTGCCCTGCCTCATTC	Klonierung des <i>atpI_{Cmet}</i> Startcodons in pECD1555/pECD1556 (<i>NheI</i> -Schnittstelle)
AH30	<i>fw</i>	CCCAATATTTCCGCGGATGTCTAGAAAA GGAGAAGAAC	Klonierung von <i>gfp+</i> in pBBR1MCS-3, <i>Template</i> pMUTIN-GFP+ (<i>SspI</i> -, <i>XbaI</i> -, <i>SacII</i> -Schnittstelle)
AH33	<i>fw</i>	TCGAATTTCTGCCATTCATCCGCT	Sequenzier-/ Kontrollprimer für pBBR1MCS-3
AH35	<i>fw</i> , <i>rev</i>	GGCACCTCGCTAACGGATTC	Kontrollprimer, bindet 2 Mal in pBBR1MCS-3
AH36	<i>fw</i>	GCGCCGCAACGATCTGAAACG	RT-PCR-Primer, bindet 41 bp stromabwärts des Startcodons von <i>Rmet 3502</i>
AH39	<i>fw</i>	CCCGGGCCCGATCGAGAACATCCAGCGTG	RT-PCR-Primer, bindet 382 bp stromabwärts des Startcodons von <i>Rmet 3503</i>
AH52	<i>rev</i>	GGGGCTAGCCACATCTTGCTGGCGCTCATCTCG	Fusionierung der ersten 84 bp von <i>atpI_{Cmet}</i> mit einem Reporter gen, (<i>NheI</i> -Schnittstelle)
AH53	<i>rev</i>	GGGGCTAGCCACCGCTTCAGCATGTGACAGC	Fusionierung der ersten 162 bp von <i>atpI_{Cmet}</i> mit einem Reporter gen, (<i>NheI</i> -Schnittstelle)
AH54	<i>fw</i>	CCCCCGCGGGGATAACCGATGCTCGTCCG	Klonierung des Bereiches 302 bp stromaufwärts des <i>atpB_{Cmet}</i> Startcodons in pECD1555/pECD1556 (<i>SacII</i> -Schnittstelle)
AH55	<i>rev</i>	GGGGCTAGCCATGTCGAAACGAACCGTATATTGC	Fusionierung des Startcodons von <i>atpB_{Cmet}</i> mit einem Reporter gen, (<i>NheI</i> -Schnittstelle)
AH56	<i>rev</i>	GCGCAATGCACGTTCCGCAAG	RT-PCR-Primer, bindet 189 bp stromabwärts des Startcodons von <i>atpI_{Cmet}</i>
AH58	<i>rev</i>	CCCGATATCCTTACTTCTTACGACGCAGGC	RT-PCR-Primer, bindet 418 bp stromabwärts des Startcodons von <i>atpC_{Cmet}</i>

2 Materialien und Methoden

AH61	<i>fw</i>	CAGCTGGATCCGCAAGTC	RT-PCR-Primer, bindet 1065 bp stromabwärts des Startcodons von <i>atpD_{Cmet}</i>
AH66	<i>rev</i>	GTATAGAGAGCCACTGCGGG	Sequenzier-/ Kontrollprimer, bindet in <i>aacC1</i>
AH76	<i>fw</i>	GGGTCTAGAGTCGCAATTGTATGCACTGG	Klonierung von <i>atpI_{pEco}</i> in pASK-IBA7plus (<i>XbaI</i> -Schnittstelle)
AH88	<i>rev</i>	CCCTTGTGCGCCCAATACG	Sequenzier-/ Kontrollprimer für pBBR1MCS-3
AH94	<i>fw</i>	GACGGTACCCCTCGAAGGGAGCAGGAGTG	Klonierung von <i>atpI_{Eco}</i> mit RBS in pECD636/ pECD637 (<i>KpnI</i> -Schnittstelle)
AH95	<i>rev</i>	CGGTCTAGAGAAGGGGTCTTTGAGGCTGAAC	Klonierung der ersten 105 bp von <i>atpI_{Eco}</i> in pECD636/ pECD637 (<i>XbaI</i> -Schnittstelle)
AH96	<i>rev</i>	GAGTCTAGAGGCCACCCGGCCTTTC	Klonierung der ersten 216 bp von <i>atpI_{Eco}</i> in pECD636/ pECD637 (<i>XbaI</i> -Schnittstelle)
AH97	<i>rev</i>	GACTCTAGACGCCTTTAAAACCGCCAA CG	Klonierung der ersten 297 bp von <i>atpI_{Eco}</i> in pECD636/ pECD637 (<i>XbaI</i> -Schnittstelle)
AH98	<i>rev</i>	GACTCTAGACCCTTTGTTGTTAATTACAGCCGGTG	Klonierung der ersten 378 bp von <i>atpI_{Eco}</i> in pECD636/ pECD637 (<i>XbaI</i> -Schnittstelle)
AH100	<i>fw</i>	GACTCTAGAACCATGATTACGGATTCACTG	Klonierung von <i>lacZ</i> in pECD1555 (<i>XbaI</i> -Schnittstelle)
AH101	<i>rev</i>	GGGATTAATTTATTTTTGACACCAGACCAACTG	<i>fw</i> , <i>SpeI</i> -Schnittstelle <i>rev</i> , <i>Template</i> pRS551)
AH142	<i>fw</i>	CCGCTCGAGGGTGCTGGCGTGAGCAAGG	Klonierung von <i>egfp/ mcherry</i> ohne Startcodon in pASK-IBA7plus (<i>XhoI</i> -Schnittstelle)
AH143	<i>rev</i>	CCCGAATTCACCTGCCCCCTTGACAGCTC	Klonierung von <i>egfp</i> ohne Stoppcodon in pASK-IBA7plus (<i>EcoRI</i> -Schnittstelle)
AH144	<i>fw</i>	CCGCCGCGGGATGCTCGAGGAGGAATTCTCTGTGTCGCTCGTGAGTC	Klonierung von <i>atpI_{Eco}</i> ohne Startcodon in pASK-IBA7plus (<i>SacII</i> -, <i>XhoI</i> -, <i>EcoRI</i> -Schnittstelle von 5' nach 3')
AH145	<i>rev</i>	CCGGATATCTTAGAGCTCCTCGTCGACATGTTCTTCAGACGCCATCGAC	Klonierung von <i>atpB_{Eco}</i> ohne Stoppcodon in pASK-IBA7plus (<i>EcoRV</i> -, <i>SalI</i> -, <i>SacI</i> -Schnittstelle von 5' nach 3')
AH146	<i>rev</i>	CCCGAGCTCACCAGCGCCCTTGACAGC	Klonierung von <i>mcherry</i> in pASK-IBA7plus (<i>SacI</i> -Schnittstelle)

2 Materialien und Methoden

AH147	<i>fw</i>	GCTTATTGCAAGGACGCCCCAGAAGG	QuickChange-Primer für den Basenaustausch in <i>atpI_{Eco}</i> ;
AH148	<i>rev</i>	GCGTCCTTGCAATAAGCGGGGGC	Änderung der AS-Sequenz von S39 zu L
AH149	<i>fw</i>	GCTTATTGCACCGACGCCCCAGAAGG	QuickChange- Primer für den Basenaustausch in <i>atpI_{Eco}</i> ;
AH150	<i>rev</i>	GCGTCGGTGCAATAAGCGGGGGC	Änderung der AS-Sequenz von S39 zu G
AH159	<i>fw</i>	CAAAGCTTTCGAAGTTCTGGCAATGTTGG	QuickChange-Primer für den Basenaustausch in <i>atpI^{K82E}_{Eco}</i> ;
AH160	<i>rev</i>	AGAACTTCGAAAGCTTTGCCAAATGCA AATG	Änderung der AS-Sequenz von E79 zu K
AH164	<i>rev</i>	CGAAAGCTTCAATACGCAAACCGCCTC	Sequenzier-/ Kontrollprimer für pUC18mini-Tn7T-Gm
AH167	<i>rev</i>	GGTTCTAGACATGATGACTCCTTTAATT TAGAGAGACTTAG	Fusionierung des Startcodons von <i>atpE_{Cmet}</i> mit einem Reportergen, (<i>XbaI</i> -Schnittstelle)
AH168	<i>fw</i>	CGAGGTACCGTCGCAATTGTATGCACTGG	Klonierung von <i>atpI_{EcoP}</i> in pUC18mini-Tn7T-Gm (<i>KpnI</i> -Schnittstelle)
AH169	<i>rev</i>	GATGGGCCCTTACCCTTTGTTGTTAATT ACAGC	Klonierung von <i>atpI_{Eco}</i> in pUC18mini-Tn7T-Gm (<i>ApaI</i> -Schnittstelle)
AH170	<i>rev</i>	GCCGGGCCCTTAGAGCTCACCAGCGCC	Klonierung von <i>egfp</i> in pUC18mini-Tn7T-Gm (<i>ApaI</i> -Schnittstelle)
AH175	<i>rev</i>	GATGGGCCCTTAGTACAGCTCGTCCATGC	Klonierung von <i>mcherry</i> in pUC18mini-Tn7T-Gm (<i>ApaI</i> -Schnittstelle)
AH182	<i>rev</i>	GAGAATCACGCAGAGCG	Sequenzier-/ Kontrollprimer, bindet in <i>phoA</i>
AH189	<i>fw</i>	GAGCATATGGCAATGACTTACCACCTG GAC	Klonierung von <i>atpC_{Eco}</i> in pRHB152 (<i>NdeI</i> -Schnittstelle <i>fw</i> , <i>BamHI</i> -Schnittstelle <i>rev</i>)
AH190	<i>rev</i>	GACGGATCCCAAGCCGGTGTTACATCG C	
FK178	<i>fw</i>	GGAAACAGCTATGACCATG	Sequenzier-/ Kontrollprimer für pUT18 und pKNT25
FK181	<i>rev</i>	GGCATCAGAGCAGATTGT	Sequenzier-/ Kontrollprimer für pUT18C
FK183	<i>rev</i>	CCAGTCACGACGTTGTAA	Sequenzier-/ Kontrollprimer für pKT25
FK290	<i>fw</i>	CGATGAATTCATGTCTGTGTCGCTCGTG AGTCG	Klonierung von <i>atpI_{Eco}</i> in den pASK-IBA3/7plus (<i>EcoRI</i> -Schnittstelle <i>fw</i> , <i>KpnI</i> -Schnittstelle <i>rev</i>)
FK291	<i>rev</i>	CGATGGTACCTTACCCTTTGTTGTTAAT TACAGC	

2 Materialien und Methoden

FK303	<i>fw</i>	CTGGAATTCCGTAAGATCCAGCGCTTC C	Klonierung des Bereiches 221 bp bis 69 bp stromaufwärts des <i>atpC_{Eco}</i> Startcodons in pRS551 (<i>EcoRI</i> -Schnittstelle <i>fw</i> ; <i>BamHI</i> -Schnittstelle <i>rev</i>)
FK304	<i>rev</i>	CTGGGATCCGTTAGAACGCCTGCTCCGG	
FK307	<i>fw</i>	CTGGAATTCTGTCGCAATTGTATGCACTG G	Klonierung des Bereiches ab 200 bp stromaufwärts des <i>atpI_{Eco}</i> Startcodons in pRS551 (<i>EcoRI</i> -Schnittstelle)
FK308	<i>rev</i>	CTGGGATCCGTATAAACTTTCTTTAAG G	Klonierung des Bereiches bis 43 bp stromaufwärts des <i>atpI_{Eco}</i> Startcodons in pRS551 (<i>BamHI</i> -Schnittstelle)
FK309	<i>rev</i>	CTGGGATCCCCACGTAACGATCAGCG	Klonierung des Bereiches bis 65 bp stromaufwärts des <i>atpB_{Eco}</i> Startcodons in pRS551 (<i>BamHI</i> -Schnittstelle)
FK310	<i>fw</i>	CTGGAATTCCGAAACGTTGCTCGGAAG C	Klonierung des Bereiches ab 368 bp stromaufwärts des <i>atpB_{Eco}</i> Startcodons in pRS551 (<i>EcoRI</i> -Schnittstelle)
FK311	<i>rev</i>	CTGGAATTCGGCGTCACCAGGCGCATA C	Klonierung des Bereiches ab 214 bp stromaufwärts des <i>atpB_{Eco}</i> Startcodons in pRS551 (<i>EcoRI</i> -Schnittstelle)
FK312	<i>rev</i>	CTGGGATCCGCGCCTGGTGACGCCAGG C	Klonierung des Bereiches bis 200 bp stromaufwärts des <i>atpB_{Eco}</i> Startcodons in pRS551 (<i>BamHI</i> -Schnittstelle)
FK323	<i>rev</i>	CTGGGATCCTTGTTGTTAATTACAGCCG G	Klonierung des Bereiches bis 16 bp stromaufwärts des <i>atpB_{Eco}</i> Startcodons in pRS551 (<i>BamHI</i> -Schnittstelle)
FK324	<i>rev</i>	CTGGGATCCCAACATCGCCAGAACTTT GAA	Klonierung des Bereiches bis 129 bp stromaufwärts des <i>atpB_{Eco}</i> Startcodons in pRS551 (<i>BamHI</i> -Schnittstelle)
FK325	<i>fw</i>	GACTCTAGAGATGGCTTCAGAAAATAT GACG	Klonierung von <i>atpB</i> in BACTH-Vektoren (<i>XbaI</i> -Schnittstelle <i>fw</i> , <i>KpnI</i> -Schnittstelle <i>rev</i>)
FK326	<i>rev</i>	CTCGGTACCCGATGTTCTTCAGACGCCA T	
FK327	<i>fw</i>	GACTCTAGAGGTGAATCTTAACGCAAC AATC	Klonierung von <i>atpF_{Eco}</i> in BACTH-Vektoren (<i>XbaI</i> -Schnittstelle <i>fw</i> , <i>KpnI</i> -Schnittstelle <i>rev</i>)
FK328	<i>rev</i>	CTCGGTACCCGAGTTCAGCGACAAGT TT	
FK338	<i>rev</i>	CTGCACTTCAAGAATGCCGC	Kontrollprimer, bindet 219 bp stromabwärts des Startcodons von <i>atpC_{Eco}</i>

2 Materialien und Methoden

FK405	<i>fw</i>	CATTTGGC <u>A</u> AAGCTTTCAAAGTTCTAGC G	QuickChange-Primer für den Basenaustausch in <i>atpI_{Eco}</i> ;
FK406	<i>rev</i>	GAAAGCTTT <u>T</u> GCCAAATGCGAATGTCCA AGCC	Änderung der AS-Sequenz von E79 zu K
FK413	<i>fw</i>	TATTC <u>CGCGGG</u> TCGCAATTGTATGCACT GG	Fusionierung des <i>atpI_{Eco}P</i> (ab 181 bp vor dem Startcodon) mit einem Reporter gen, (<i>Sac</i> II-Schnittstelle)
FK414	<i>rev</i>	CTTTT <u>TCTAGAG</u> TGTTAATTACAGCCGG	Fusionierung der ersten 372 bp von <i>atpI_{Eco}</i> mit einem Reporter gen, (<i>Xba</i> I-Schnittstelle)
FK416	<i>rev</i>	CTTTT <u>TCTAGAG</u> AGCGACACAGACATCA C	Fusionierung der ersten 15 bp von <i>atpI_{Eco}</i> mit einem Reporter gen, (<i>Xba</i> I-Schnittstelle)
FK429	<i>rev</i>	CTTTT <u>TCTAGA</u> ATTTTCTGAAGCCATGAT	Fusionierung der ersten 15 bp von <i>atpB_{Eco}</i> mit einem Reporter gen, (<i>Xba</i> I-Schnittstelle)
FK431	<i>fw</i>	TATTC <u>CGCGGG</u> GCGATGTTGGTGTACTG G	Kontrollprimer, bindet 268 bp stromabwärts des <i>atpI_{Eco}</i> Startcodon
FK439	<i>rev</i>	CCGCTTATTGCAGAGACGCC	Kontrollprimer, bindet 125 bp stromabwärts des <i>atpI_{Eco}</i> Startcodon
FK466	<i>fw</i>	GACT <u>TCTAGAG</u> ATGTCTGAATTTATTACG GTAG	Klonierung von <i>atpH_{Eco}</i> in BACTH-Plasmide (<i>Xba</i> I-Schnittstelle <i>fw</i> ,
FK467	<i>rev</i>	CTCGGT <u>ACCCG</u> AGACTGCAAGACGTCT GCAAG	<i>Kpn</i> I-Schnittstelle <i>rev</i>)
FK468	<i>fw</i>	GACT <u>TCTAGAG</u> ATGGCAATGACTTACCA CC	Klonierung von <i>atpC_{Eco}</i> in BACTH-Vektoren (<i>Xba</i> I-Schnittstelle <i>fw</i> ,
FK469	<i>rev</i>	CTCGGT <u>ACCCG</u> CATCGCTTTTTTGGTCA AC	<i>Kpn</i> I-Schnittstelle <i>rev</i>)
FK472	<i>fw</i>	CGAAGCTTTCGAAGTTCTGGCAATGTT GG	QuickChange-Primer für den Basenaustausch in <i>atpI_{Eco}</i> ;
FK473	<i>rev</i>	AGAACTTCGAAAGCTTCGCCAAATGCA AATG	Änderung der AS-Sequenz von K82 zu E
FK474	<i>fw</i>	TAAGCGGGGTCTTGGCAGTCTTTCTTCC	QuickChange-Primer für den Basenaustausch in <i>atpI_{Eco}</i> ;
FK475	<i>rev</i>	CTGCCAGGACCCCGCTTATTGCAGATA CG	Änderung der AS-Sequenz von G43 zu V
FK482	<i>fw</i>	CGAT <u>GAATTC</u> ATGGCTTCAGAAAATAT GACG	Klonierung von <i>atpBEF_{Eco}</i> in pASK-IBA3plus (<i>Eco</i> RI-Schnittstelle)
FK484	<i>rev</i>	CGAT <u>GGTACCC</u> AGTTCAGCGACAAGTT TATCC	Klonierung von <i>atp(I)BEF_{Eco}</i> in pASK-IBA3plus (<i>Kpn</i> I-Schnittstelle)

2 Materialien und Methoden

FK493	<i>rev</i>	CTTT <u>CTAG</u> AATTCAGGTTTTCCATGAC	Klonierung der ersten 15 bp von <i>atpE_{Eco}</i> in pECD1555/pECD1556 (<i>Xba</i> I-Schnittstelle)
GA917	<i>fw</i>	AAAGGTACCTGAAAAAGGAAGAGTATG	Amplifikation von <i>blaM'</i> mit (GA917) und ohne (GA918) 78 bp seinem Startcodon von pECD618 und pECD619 (<i>Kpn</i> I-Schnittstelle <i>fw</i> , <i>Xba</i> I-Schnittstelle <i>rev</i>)
GA918	<i>fw</i>	AAAGGTACCTGAAAAAGGAAGAGTATGCTGGTGAAAGTAAAAGAT	
GA919	<i>rev</i>	AAATCTAGATCCTGCAACTTTATCCGC	
NP5	<i>fw</i>	GCGATGTTGGG ³ GTTACTGGTGGTGGCTTTG	QuickChange-Primer für den Basenaustausch in <i>atpI_{Eco}</i> ; Änderung der AS-Sequenz von V88 zu G
NP6	<i>rev</i>	ACCACCAGTAAC ³ CCAACATCGCCAGGACT	
SB1	<i>fw</i>	GACTCTAGAGATGTCTGTGTCGCTCGT ² AG	Klonierung von <i>atpI_{Eco}</i> in BACTH-Vektoren (<i>Xba</i> I-Schnittstelle <i>fw</i> , <i>Kpn</i> I-Schnittstelle <i>rev</i>)
SB2	<i>rev</i>	CTCGGTACCCGCCCTTTGTTGTTAATTA ² CA	
SB4	<i>fw</i>	GACTCTAGAGATGGAAAACCTGAATAT ² GGA	Klonierung von <i>atpE_{Eco}</i> in BACTH-Vektoren (<i>Xba</i> I-Schnittstelle <i>fw</i> , <i>Kpn</i> I-Schnittstelle <i>rev</i>)
SB5	<i>rev</i>	CTCGGTACCCGCGCGACAGCGAACATCACG	
lacZRalsti-Fusion	<i>rev</i>	CACAGATGAAACGCCGAGTTAACG	Sequenzier-/ Kontrollprimer für Plasmide mit <i>lacZ</i>
pASKfw	<i>fw</i>	AAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAA	Sequenzier-/ Kontrollprimer für pASK-IBA3/7plus Plasmide
pASKrev	<i>rev</i>	CGGTAAACGGCAGACAAAAAAAATG	Sequenzier-/ Kontrollprimer für pASK-IBA3/7plus Plasmide
pGEMfw	<i>fw</i>	GCGAAAGGGGGATGTGCTGC	Sequenzier-/ Kontrollprimer für pGEM-T Easy Plasmide
pGEMrev	<i>rev</i>	CGCCTGCAGGTCGACCATAT	Sequenzier-/ Kontrollprimer für pGEM-T Easy Plasmide

¹Die Orientierung der Primer (*fw* für *forward*, *rev* für *reverse*) richtet sich nach der Leserichtung des Gens, in dem sie binden. ²Die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, Basenaustausche rot hervorgehoben. ³Zur Unterscheidung ob die Primer im Chromosom von *E. coli* oder *C. metallidurans* binden, wurde an die entsprechenden Gene *Eco* für *E. coli* oder *Cmet* für *C. metallidurans* angehängt.

2.2.5 Restriktionsverdau mit Endonukleasen und Ligation

Der Restriktionsverdau von Fragment-DNA und Vektor erfolgte mit Enzymen und Puffern von Thermo Scientific™ und New England Biolabs® GmbH nach Herstellerprotokoll. Ein Ansatz von insgesamt 30 µl mit jeweils 0,5 µl Enzym wurde für 3 h bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gereinigt (siehe 2.3.8) und ihre Konzentration gemessen.

2 Materialien und Methoden

Für die Ligation wurden 1 µl 10x T4-Ligase-Puffer (Thermo Scientific™), 30-50 µg Vektor-DNA, die dreifache Molekülmenge Fragment-DNA und 0,5 µl T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific™) mit H₂O_{dd} auf 10 µl aufgefüllt, gemischt und über Nacht in Eiswasser schwimmend bei umgebender Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation von *E. coli* DH5α mit dem Ligationsansatz. Als Kontrolle diente ein Ligationsansatz ohne Fragment-DNA. Zum Test auf den Ligationserfolg wurden Kontroll-PCRs durchgeführt und die neuen Sequenzbereiche im Plasmid durch die Microsynth AG sequenziert. Alle in dieser Arbeit entstandenen und verwendeten Plasmide sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Die Tabelle setzt sich auf den folgenden Seiten fort.

Name	Beschreibung ¹	Herkunft
Plasmide für die Messung der Promotoraktivität		
pRS551	Plasmid für die Herstellung transkriptionaler Fusionen mit <i>lacZ</i>	Simons <i>et al.</i> , 1987
pECD1278	pRS551 Derivat, exprimiert <i>lacZ</i> unter Kontrolle von <i>atpIp_{Eco}</i> (FK307, FK308)	diese Arbeit
pECD1284	pRS551 Derivat, <i>atpIp_{atpBp₁Bp_{2Eco}}</i> (FK307, FK323)	diese Arbeit
pECD1285	pRS551 Derivat, exprimiert <i>lacZ</i> unter Kontrolle von <i>atpBp₁Bp_{2Eco}</i> (FK310, FK323)	diese Arbeit
pECD1280	pRS551 Derivat, exprimiert <i>lacZ</i> unter Kontrolle von <i>atpBp_{1Eco}</i> (FK310, FK324)	diese Arbeit
pECD1282	pRS551 Derivat, exprimiert <i>lacZ</i> unter Kontrolle von <i>atpBp_{1Eco}</i> -stl (ohne Stamm-Schleifen-Struktur nach <i>atpBp₁</i> ; FK310, FK312)	diese Arbeit
pECD1281	pRS551 Derivat, exprimiert <i>lacZ</i> unter Kontrolle von <i>atpBp_{2Eco}</i> (FK311, FK323)	diese Arbeit
pECD1283	pRS551 Derivat, exprimiert <i>lacZ</i> unter Kontrolle von <i>atpBp_{2Eco}</i> -stl (ohne Stamm-Schleifen-Struktur nach <i>atpBp₂</i> ; FK311, FK309)	diese Arbeit
pECD1279	pRS551 Derivat, exprimiert <i>lacZ</i> unter Kontrolle von <i>atpCp_{Eco}</i> (FK303, FK304)	diese Arbeit
pBBR1MCS-3	Klonierungsvektor, der u.a. in <i>E. coli</i> und <i>C. metallidurans</i> repliziert wird	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pMUTIN-GFP+	Integrationsvektor für <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Template</i> für die Amplifizierung von <i>gfp+</i>	Kaltwasser <i>et al.</i> , 2002
pECD794-1	pLO2-Derivat für <i>lacZ</i> -Transkriptionsfusionen, <i>Template</i> für Amplifizierung von <i>lacZ</i>	(Scherer und Nies, 2009)
pECD1555	pBBR1MCS-3 Derivat für die Herstellung translationaler Fusionen mit <i>'gfp+</i> (AH23, AH30)	diese Arbeit

2 Materialien und Methoden

pECD1556	pECD1555 Derivat für die Herstellung translationaler Fusionen mit <i>'lacZ</i> (AH100, AH101)	diese Arbeit
pECD1557	pECD1556 Derivat für die Expression von <i>atpIp-atpI15_{Eco}'-lacZ</i> (FK413, FK416)	diese Arbeit
pECD1558	pECD1556 Derivat für die Expression von <i>atpIp-atpI372_{Eco}'-lacZ</i> (FK413, FK414)	diese Arbeit
pECD1559	pECD1556 Derivat für die Expression von <i>atpIp-atpB15_{Eco}'-lacZ</i> (FK413, FK429)	diese Arbeit
pECD1560	pECD1556 Derivat für die Expression von <i>atpIp-atpE15_{Eco}'-lacZ</i> (FK413, FK493)	diese Arbeit
pECD1578	pECD1556 Derivat für die Expression von <i>atpIp-atpI3_{Cmet}'-lacZ</i> (AH24, AH25)	diese Arbeit
pECD1579	pECD1556 Derivat für die Expression von <i>atpIp-atpI84_{Cmet}'-lacZ</i> (AH24, AH52)	diese Arbeit
pECD1580	pECD1556 Derivat für die Expression von <i>atpIp-atpI162_{Cmet}'-lacZ</i> (AH24, AH53)	diese Arbeit
pECD1581	pECD1556 Derivat für die Expression von <i>atpBp-atpB3_{Cmet}'-lacZ</i> (AH54, AH55)	diese Arbeit
pECD1582	pECD1556 Derivat für die Expression von <i>atpIp-atpB3_{Cmet}'-lacZ</i> (AH24, AH55)	diese Arbeit
pECD1583	pECD1556 Derivat für die Expression von <i>atpBp-atpE3_{Cmet}'-lacZ</i> (AH54, AH167)	diese Arbeit
pECD1584	pECD1556 Derivat für die Expression von <i>atpIp-atpE3_{Cmet}'-lacZ</i> (AH24, AH167)	diese Arbeit

Plasmide für die Bestimmung der Orientierung von Transmembrandomänen in der Membran

pGP1-2	Helferplasmid für die Expression der T7 RNA-Polymerase	Tabor und Richardson, 1985
pECD636	pGEM [®] -T Easy Derivat für die Expression von translationalen Genfusionen mit <i>'lacZ</i> unter Kontrolle des T7 Promotors	Plasmid-Sammlung AG Nies
pECD1391	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI35_{Eco}'-lacZ</i> (AH94, AH95)	diese Arbeit
pECD1392	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI72_{Eco}'-lacZ</i> (AH94, AH96)	diese Arbeit
pECD1393	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI99_{Eco}'-lacZ</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit
pECD1394	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI126_{Eco}'-lacZ</i> (AH94, AH98)	diese Arbeit
pECD1502	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI^{S39L}99_{Eco}'-lacZ</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit
pECD1503	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI^{S39G}99_{Eco}'-lacZ</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit
pECD1504	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI^{G43V}99_{Eco}'-lacZ</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit

2 Materialien und Methoden

	(AH94, AH97)		
pECD1505	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{E79K} 99 _{Eco} '-' <i>lacZ</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit	
pECD1506	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{K82E} 99 _{Eco} '-' <i>lacZ</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit	
pECD1507	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{E79K, K82E} 99 _{Eco} '-' <i>lacZ</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit	
pECD1508	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{V88G} 99 _{Eco} '-' <i>lacZ</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit	
pECD1395	pECD636 Derivat für die Expression von <i>blaM</i> '-' <i>lacZ</i> (GA917, GA919)	diese Arbeit	
pECD1396	pECD636 Derivat für die Expression von ' <i>blaM</i> '-' <i>lacZ</i> (GA917, GA918), von ' <i>blaM</i> ' fehlen 26 AS nach dem ersten Met	diese Arbeit	
pECD637	pGEM [®] -T Easy Derivat für die Expression von translationalen Genfusionen mit ' <i>phoA</i> unter Kontrolle des T7 Promotors	Plasmid-Sammlung Nies	AG
pECD1397	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI35</i> _{Eco} '-' <i>phoA</i> (AH94, AH95)	diese Arbeit	
pECD1398	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI72</i> _{Eco} '-' <i>phoA</i> (AH94, AH96)	diese Arbeit	
pECD1399	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI99</i> _{Eco} '-' <i>phoA</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit	
pECD1400	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI126</i> _{Eco} '-' <i>phoA</i> (AH94, AH98)	diese Arbeit	
pECD1511	pECD1400 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{S39L} 126 _{Eco} '-' <i>phoA</i> (AH147, AH148)	diese Arbeit	
pECD1512	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{S39L} 99 _{Eco} '-' <i>phoA</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit	
pECD1513	pECD1400 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{S39G} 126 _{Eco} '-' <i>phoA</i> (AH149, AH150)	diese Arbeit	
pECD1514	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{S39G} 99 _{Eco} '-' <i>phoA</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit	
pECD1515	pECD1400 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{G43V} 126 _{Eco} '-' <i>phoA</i> (FK474, FK475)	diese Arbeit	
pECD1516	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{G43V} 99 _{Eco} '-' <i>phoA</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit	
pECD1517	pECD1400 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{E79K} 126 _{Eco} '-' <i>phoA</i> (FK405, FK406)	diese Arbeit	
pECD1518	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{E79K} 99 _{Eco} '-' <i>phoA</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit	
pECD1519	pECD1400 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{K82E} 126 _{Eco} '-' <i>phoA</i> (FK472, FK473)	diese Arbeit	
pECD1520	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{K82E} 99 _{Eco} '-' <i>phoA</i>	diese Arbeit	

2 Materialien und Methoden

	(AH94, AH97)		
pECD1521	pECD1519 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{E79K, K82E} _{Eco} -' <i>phoA</i> (AH159, AH160)	diese Arbeit	
pECD1522	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{E79K, K82E} _{Eco} -' <i>phoA</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit	
pECD1523	pECD1400 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{V88G} _{Eco} -' <i>phoA</i> (NP5, NP6)	diese Arbeit	
pECD1524	pECD636 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{V88G} _{Eco} -' <i>phoA</i> (AH94, AH97)	diese Arbeit	
pECD618	pECD636 Derivat für die Expression von ' <i>blaM</i> '-' <i>phoA</i> , von ' <i>blaM</i> ' fehlen 26 AS nach dem ersten Met	Plasmid-Sammlung Nies	AG
pECD619	pECD636 Derivat für die Expression von ' <i>blaM</i> '-' <i>phoA</i>	Plasmid-Sammlung Nies	AG

Plasmide für den BACTH-Assay

pGEM [®] -T Easy	Klonierungsvektor	Promega, Madison (USA)	
pECD1409	pGEM [®] -T Easy Derivat, <i>atpI</i> _{Eco} (SB1, SB2), <i>Template</i> für die QuickChange [™] <i>site-directed mutagenesis</i> PCR	diese Arbeit	
pECD1410	pECD1409 Derivat, <i>atpI</i> ^{G43V} _{Eco} (FK474, FK475)	diese Arbeit	
pECD1411	pECD1409 Derivat, <i>atpI</i> ^{E79K} _{Eco} (FK405, FK406)	diese Arbeit	
pECD1412	pECD1409 Derivat, <i>atpI</i> ^{K82E} _{Eco} (FK472, FK473)	diese Arbeit	
pECD1413	pECD1409 Derivat, <i>atpI</i> ^{V88G} _{Eco} (NP5, NP6)	diese Arbeit	
pUT18	Plasmid für die Fusion eines Gens an den N-Terminus des T18-Fragments von <i>cyaA</i> für den BACTH-Assay	Karimova <i>et al.</i> , 2001	
pUT18C	Plasmid für die Fusion eines Gens an den C-Terminus des T18-Fragments von <i>cyaA</i> für den BACTH-Assay	Karimova <i>et al.</i> , 2001	
pKT25	Plasmid für die Fusion eines Gens an den C-Terminus des T25-Fragments von <i>cyaA</i> für den BACTH-Assay	Karimova <i>et al.</i> , 2001	
pKNT25	Plasmid für die Fusion eines Gens an den N-Terminus des T25-Fragments von <i>cyaA</i> für den BACTH-Assay	(Karimova <i>et al.</i> , 2005)	
pECD1300	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> _{Eco} -' <i>cyaA</i> T18 (SB1, SB2)	diese Arbeit	
pECD1301	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaA</i> T18'- <i>atpI</i> _{Eco} (SB1, SB2)	diese Arbeit	
pECD1302	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaA</i> T25'- <i>atpI</i> _{Eco} (SB1, SB2)	diese Arbeit	
pECD1303	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> _{Eco} -' <i>cyaA</i> T25 (SB1, SB2)	diese Arbeit	
pECD1547	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{S39G} _{Eco} -' <i>cyaA</i> T18 (SB1, SB2)	diese Arbeit	
pECD1548	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaA</i> T18'- <i>atpI</i> ^{S39G} _{Eco} diese Arbeit	diese Arbeit	

2 Materialien und Methoden

	(SB1, SB2)	
pECD1549	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpI</i> ^{S39G} _{Eco}	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1550	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{S39G} _{Eco} '-' <i>cyaAT25</i>	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1543	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{S39L} _{Eco} '-' <i>cyaAT18</i>	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1544	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaAT18</i> '-' <i>atpI</i> ^{S39L} _{Eco}	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1545	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpI</i> ^{S39L} _{Eco}	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1546	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{S39L} _{Eco} '-' <i>cyaAT25</i>	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1418	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{G43V} _{Eco} '-' <i>cyaAT18</i>	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1419	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaAT18</i> '-' <i>atpI</i> ^{G43V} _{Eco}	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1420	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpI</i> ^{G43V} _{Eco}	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1421	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{G43V} _{Eco} '-' <i>cyaAT25</i>	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1422	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{E79K} _{Eco} '-' <i>cyaAT18</i>	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1423	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaAT18</i> '-' <i>atpI</i> ^{E79K} _{Eco}	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1424	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpI</i> ^{E79K} _{Eco}	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1425	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{E79K} _{Eco} '-' <i>cyaAT25</i>	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1426	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{K82E} _{Eco} '-' <i>cyaAT18</i>	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1427	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaAT18</i> '-' <i>atpI</i> ^{K82E} _{Eco}	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1428	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpI</i> ^{K82E} _{Eco}	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1429	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{K82E} _{Eco} '-' <i>cyaAT25</i>	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1551	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{E79K, K82E} _{Eco} '-' <i>cyaAT18</i>	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1552	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaAT18</i> '-' <i>atpI</i> ^{E79K, K82E} _{Eco}	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1553	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpI</i> ^{E79K, K82E} _{EcoEco}	diese Arbeit (SB1, SB2)
pECD1554	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{E79K, K82E} _{Eco} '-'	diese Arbeit

2 Materialien und Methoden

	' <i>cyaAT25</i> (SB1, SB2)	
pECD1430	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{V88G} _{Eco} '-' <i>cyaAT18</i> (SB1, SB2)	diese Arbeit
pECD1431	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaAT18</i> '-' <i>atpI</i> ^{V88G} _{Eco} (SB1, SB2)	diese Arbeit
pECD1432	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpI</i> ^{V88G} _{Eco} (SB1, SB2)	diese Arbeit
pECD1433	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpI</i> ^{V88G} _{Eco} '-' <i>cyaAT25</i> (SB1, SB2)	diese Arbeit
pECD1401	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpB</i> _{Eco} '-' <i>cyaAT18</i> (FK325, FK326)	diese Arbeit
pECD1402	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaAT18</i> '-' <i>atpB</i> _{Eco} (FK325, FK326)	diese Arbeit
pECD1403	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpB</i> _{Eco} (FK325, FK326)	diese Arbeit
pECD1404	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpB</i> _{Eco} '-' <i>cyaAT25</i> (FK325, FK326)	diese Arbeit
pECD1316	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpE</i> _{Eco} '-' <i>cyaAT18</i> (SB4, SB5)	diese Arbeit
pECD1317	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaAT18</i> '-' <i>atpE</i> _{Eco} (SB4, SB5)	diese Arbeit
pECD1318	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpE</i> _{Eco} (SB4, SB5)	diese Arbeit
pECD1319	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpE</i> _{Eco} '-' <i>cyaAT25</i> (SB4, SB5)	diese Arbeit
pECD1405	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpF</i> _{Eco} '-' <i>cyaAT18</i> (FK327, FK328)	diese Arbeit
pECD1406	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaAT18</i> '-' <i>atpF</i> _{Eco} (FK327, FK328)	diese Arbeit
pECD1407	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpF</i> _{Eco} (FK327, FK328)	diese Arbeit
pECD1408	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpF</i> _{Eco} '-' <i>cyaAT25</i> (FK327, FK328)	diese Arbeit
pECD1531	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpH</i> _{Eco} '-' <i>cyaAT18</i> (FK466, FK467)	diese Arbeit
pECD1532	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaAT18</i> '-' <i>atpH</i> _{Eco} (FK466, FK467)	diese Arbeit
pECD1533	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpH</i> _{Eco} (FK466, FK467)	diese Arbeit
pECD1534	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpH</i> _{Eco} '-' <i>cyaAT25</i> (FK466, FK467)	diese Arbeit
pECD1535	pUT18 Derivat für die Expression von <i>atpC</i> _{Eco} '-' <i>cyaAT18</i> (FK468, FK469)	diese Arbeit
pECD1536	pUT18C Derivat für die Expression von <i>cyaAT18</i> '-' <i>atpC</i> _{Eco} (FK468, FK469)	diese Arbeit

2 Materialien und Methoden

	(FK468, FK469)	
pECD1537	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>atpC_{Eco}</i> (FK468, FK469)	diese Arbeit
pECD1538	pKNT25 Derivat für die Expression von <i>atpC_{Eco}</i> '-' <i>cyaAT25</i> (FK468, FK469)	diese Arbeit
pECD1296	pUT18 Derivat für die Expression von <i>cynS_{Eco}</i> '-' <i>cyaAT18</i>	diese Arbeit
pECD1298	pKT25 Derivat für die Expression von <i>cyaAT25</i> '-' <i>cynS_{Eco}</i>	diese Arbeit
<hr/>		
Plasmide für die Synthese von Proteinen		
pASK-IBA7plus	Expressionsvektor für die N-terminale Fusion eines <i>Strep</i> -tag® II an ein Protein	IBA GmbH, Göttingen
pECD1588	pASK-IBA7plus Derivat für die Expression von <i>Strep-atpI_{Eco}</i> (FK290, FK291)	diese Arbeit
pECD1527	pASK-IBA7plus Derivat für die Expression von <i>Strep-atpI^{S39L}_{Eco}</i> (FK290, FK291)	diese Arbeit
pECD1528	pASK-IBA7plus Derivat für die Expression von <i>Strep-atpI^{S39G}_{Eco}</i> (FK290, FK291)	diese Arbeit
pECD1414	pASK-IBA7plus Derivat für die Expression von <i>Strep-atpI^{G43V}_{Eco}</i> (FK290, FK291)	diese Arbeit
pECD1415	pASK-IBA7plus Derivat für die Expression von <i>Strep-atpI^{E79K}_{Eco}</i> (FK290, FK291)	diese Arbeit
pECD1416	pASK-IBA7plus Derivat für die Expression von <i>Strep-atpI^{K82E}_{Eco}</i> (FK290, FK291)	diese Arbeit
pECD1529	pASK-IBA7plus Derivat für die Expression von <i>Strep-atpI^{E97K, K82E}_{Eco}</i> (FK290, FK291)	diese Arbeit
pECD1417	pASK-IBA7plus Derivat für die Expression von <i>Strep-atpI^{V88G}_{Eco}</i> (FK290, FK291)	diese Arbeit
pECD1332	pECD1588 Derivat für die Expression von <i>Strep-atpI_{Eco}</i> und <i>atpE_{Eco}</i> (FK292, FK293)	diese Arbeit
pRHB152	pET28a+ Derivat für die N- oder C-terminale Fusion eines Proteins mit einem His-tag	Geschenk von Basem Soboh
pECD1589	pRHB152 Derivat für die Expression von His- <i>atpC_{Eco}</i> (AH189, AH190)	diese Arbeit
pASK-IBA3plus	Expressionsvektor für die C-terminale Fusion eines <i>Strep</i> -tag® II an ein Protein	IBA GmbH, Göttingen
pECD1585	pASK-IBA3plus Derivat für die Expression von <i>atpI_{Eco}-Strep</i> (FK290, FK291)	diese Arbeit
pECD1586	pASK-IBA3plus Derivat für die Expression von <i>atpB-E-atpF_{Eco}-Strep</i> (FK482, FK484)	diese Arbeit
pECD1587	pASK-IBA3plus Derivat für die Expression von <i>atpI-E-atpF_{Eco}-Strep</i> (FK290, FK484)	diese Arbeit
<hr/>		
Plasmide für die Integration von Genen in das Chromosom von <i>E. coli</i>		
pTNS2	Helferplasmid, welches die TnsABCD Untereinheiten kodiert	Choi und Schweizer, 2006

2 Materialien und Methoden

pUC18mini-Tn7T-Gm	Integrationsvektor für Gram ⁻ -Bakterien	Choi und Schweizer, 2006
pAD301	Expressionsvektor als <i>Template</i> für die Amplifizierung von <i>egfp</i>	Geschenk von Andreas Diepold der Universität von Oxford
pAD304	Expressionsvektor als <i>Template</i> für die Amplifizierung von <i>mcherry</i>	Geschenk von Andreas Diepold der Universität von Oxford
pECD1590	pASK-IBA7plus Derivat mit ' <i>atpI-atpB_{Eco}</i> ', Zwischenschritt für die Klonierung von ' <i>atpIp-atpI_{Eco}'-strep-egfp'-atpI-atpB_{Eco}'-mcherry</i> (AH144, AH145)	diese Arbeit
pECD1591	pECD1590 Derivat mit ' <i>atpI-atpB_{Eco}'-mcherry</i> , Zwischenschritt für die Klonierung von ' <i>atpIp-atpI_{Eco}'-strep-egfp'-atpI-atpB_{Eco}'-mcherry</i> (AH142, AH146)	diese Arbeit
pECD1592	pECD1591 Derivat mit ' <i>egfp'-atpI-atpB_{Eco}'-mcherry</i> , Zwischenschritt für die Klonierung von ' <i>atpIp-atpI_{Eco}'-strep-egfp'-atpI-atpB_{Eco}'-mcherry</i> (AH142, AH143)	diese Arbeit
pECD1593	pECD1592 Derivat mit ' <i>atpIp-atpI_{Eco}'-strep-egfp'-atpI-atpB_{Eco}'-mcherry</i> , <i>Template</i> für die Herstellung weiterer Plasmide (AH76, FK416)	diese Arbeit
pECD1594	pUC18mini-Tn7T-Gm Derivat für die Integration von ' <i>atpIp-atpI_{Eco}'-strep-egfp</i> ins Chromosom von <i>E. coli</i> (AH168, AH175)	diese Arbeit
pECD1595	pUC18mini-Tn7T-Gm Derivat für die Integration von ' <i>atpIp-atpI_{Eco}'-strep-egfp'-atpI_{Eco}</i> ins Chromosom von <i>E. coli</i> (AH168, AH169)	diese Arbeit
pECD1596	pUC18mini-Tn7T-Gm Derivat für die Integration von ' <i>atpIp-atpI_{Eco}'-strep-egfp'-atpI-atpB_{Eco}'-mcherry</i> ins Chromosom von <i>E. coli</i> (AH168, AH170)	diese Arbeit
pECD1597	pUC18mini-Tn7T-Gm Derivat für die Integration von ' <i>atpIp-atpI_{Eco}</i> ins Chromosom von <i>E. coli</i> (AH168, AH169)	diese Arbeit

¹Die für die Amplifikation der Fragment-DNA bzw. *Quick-Change site-directed mutagenesis*-PCR verwendeten Primer sind in Klammern angegeben, sofern die Plasmide in dieser Arbeit hergestellt wurden.

2.2.6 *Quick-Change site-directed mutagenesis*-PCR (nach Zheng *et al.* 2004)

Eine weitere Anwendung der PCR war die *Quick-Change site-directed mutagenesis*-PCR, die für Basen-Austausche in Plasmiden herangezogen wurde. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes war wie in Abschnitt 2.2.4 bei Verwendung der *Taq*-Polymerase beschrieben. Als *Template* diente ein möglichst kleines Plasmid mit dem Gen, in dem ein Basen-Austausch stattfinden sollte. Die Primer wurden so designt, dass die auszutauschenden Aminosäuren einen optimalen Abstand zum 5' und 3'-Ende aufwiesen. Dabei waren die Primer nicht direkt komplementär zueinander, sondern überlappten sich. In den in Tab. 4 aufgeführten Primern

für den Basen-Austausch wurden die nicht zum *Template* komplementären Aminosäuren fett und rot hervorgehoben.

Im PCR-Programm erfolgte zunächst ein Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 min, darauf folgten 17 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 1 min, *Annealing* der Primer für 1 min und *Elongation* bei 72 °C. Zum Abschluss des Programms inkubierte der Ansatz 1 h bei 72 °C und wurde nach Beendigung auf 8 °C abgekühlt. Der Erfolg der PCR wurde über ein 1 %iges Agarosegel (siehe 2.2.9) überprüft. War die PCR erfolgreich, wurde das PCR-Produkt mit dem GeneJET PCR Purification Kit gereinigt (siehe Abschnitt 2.2.7) und ein *DpnI*-Verdau (DNA, 0,3 U/μl Enzym, 1x CutSmart-Puffer [NEB]) angesetzt. Der Ansatz inkubierte 2 h bei 37 °C. Anschließend wurden 2,5 μl davon für eine Hitzeschock-Transformation eingesetzt (siehe Abschnitt 2.3.1). Die Überprüfung des Basen-Austausches erfolgte mittels Sequenzierung durch die Microsynth AG.

2.2.7 Isolierung und Reinigung von DNA

Für die Isolierung und Reinigung von DNA wurden Kits von Thermo Scientific™ verwendet: GeneJET Genomic DNA Purification Kit zur Isolierung chromosomaler DNA von *E. coli* und *C. metallidurans*, GeneJET Plasmid Miniprep Kit zur Isolierung von Plasmiden, GeneJET PCR Purification Kit zur Reinigung von DNA-Fragmenten. Sollte aus einem Gemisch unterschiedlich großer DNA-Fragmente nur ein Fragment bestimmter Größe verwendet werden, wurde es mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit von Qiagen nach der Gelelektrophorese aus einem Agarosegel gereinigt. In jedem Fall wurden die Angaben des Herstellers zur Durchführung befolgt, wobei die Elution der DNA mit H₂O_{dd} erfolgte. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationen von DNA und RNA wurden mit Hilfe des NanoDrop®ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, USA) über die Absorption bei 260 nm ermittelt. Der Koeffizient aus der Absorption bei 260 und 280 nm gab Aufschluss über die Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol. Die RNA wurde verwendet, wenn er bei 2,0 ± 0,3 lag.

2.2.9 Trennung von DNA über ein Agarosegel

Die Trennung von DNA erfolgte soweit nicht anders angegeben über ein 1 %-iges Agarosegel (1 % Agarose aufgekocht in 1x TAE-Puffer [0,04 M Tris-Base, 0,11 % Essigsäure [v/v], 1 mM EDTA]). Ethidiumbromid wurde kurz vor dem Gießen des Gels zugesetzt. Die DNA-Probe wurde vor dem Beladen des Gels 1:5 mit 5xDNA-Ladepuffer (40 % [v/v] Glycerin;

0,1 % [w/v] SDS; 0,1 M EDTA; 0,2 % [w/v] Bromphenolblau) gemischt. Für die Trennung unterschiedlich langer DNA-Fragmente lag eine Spannung von 120 V an.

2.2.10 Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese

Die Länge linearer DNA-Fragmente in Agarosegelen wurde mit den DNA-Größenstandards *Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder* (Fragmente der Länge [bp]: 3000, 2000, 1500, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100) und *Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder* (Fragmente der Länge [bp]: 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250) von Thermo Scientific (USA) bestimmt. Die Fragmente mit den hervorgehobenen Längen sind höher konzentriert.

2.3 Methoden zur Aufnahme fremder DNA

Bei *E. coli* und *C. metallidurans* handelt es sich um Organismen ohne natürliche genetische Kompetenz. Damit sie dennoch DNA aufnehmen, wurden verschiedene Methoden verwendet, die im Folgenden beschrieben sind. Im Anschluss an die Transformation oder Konjugation wurden Reinigungsausstriche der erhaltenen Kolonien angefertigt und die Aufnahme der Fremd-DNA mit Hilfe einer PCR überprüft.

2.3.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde eine Kultur des gewünschten *E. coli* Stammes bei 37 °C in LB-Medium angezogen (Abschnitt 2.1.2). Die Hauptkultur wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5±0,1 für 20 min auf Eis inkubiert bevor die Zellen in der Zentrifuge Universal 30 RF (Hettich Lab Technology, Deutschland) 15 min bei 5000 rpm pelletierten. Während der folgenden Schritte verblieben die Zellen auf Eis beziehungsweise 4 °C und die verwendeten Lösungen wurden ebenfalls auf eine Temperatur von 4 °C gekühlt. Zum Waschen wurden die Zellen in 0,1 M CaCl₂ suspendiert und erneut mit 5000 rpm für 15 min zentrifugiert. Abschließend wurden sie in CaCl₂ (1/50stel des Ausgangsvolumens) suspendiert und die gleiche Menge an 50 % [v/v] Glycerin zugegeben. Die Lagerung erfolgte in 100 µl-Aliquots bei -80 °C.

Für die Transformation tauten die Zellen auf Eis auf und inkubierten nach Zugabe von 50 µg Plasmid beziehungsweise des gesamten Ligationsansatzes für weitere 30 min auf Eis. Anschließend erfolgte für 90 s ein Hitzeschock bei 42 °C. Die Zellen wurden sofort wieder auf Eis gestellt, wo sie für 5 min verblieben. Nach Zugabe von 0,5 ml LB schüttelten die Zellen 1 h bei 37 °C mit 700 rpm im MaxQ4000 Shaker (Thermo Scientific™). Wurden Plasmide transformiert, wurden 100 µl der Zellen auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden

Antibiotika ausplattiert. Bei der Transformation von Ligationsansätzen wurde alles ausplattiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei 30 °C/37 °C.

2.3.2 Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation (Dower *et al.*, 1988)

Für die Herstellung elektrisch kompetenter Zellen von *E. coli* erfolgte die Anzucht wie in 2.1.2 beschrieben in SOB-Medium (40 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 17 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7,0 mit NaOH eingestellt). Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5±0,1 kühlten die Zellen 20 min auf Eis ab und pelletierten im Anschluss 15 min mit 5000 rpm in der Hettich Zentrifuge. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zwei Mal mit sterilem H₂O_{dd} gewaschen. Nun wurde das Pellet in 10 % Glycerin suspendiert (doppeltes Volumen des Pellets). Für die Transformation wurde zu 50 µl Aliquots der kompetenten Zellen DNA zugegeben, gemischt und in eine Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand, Cell Projects Ltd.) überführt. Die Küvette wurde in den Gen Pulser (BioRad, München) eingespannt und ein Impuls mit 1,8 kV gegeben. Sofort im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium (SOB-Medium mit 20 mM Glukose) aufgenommen und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Hälfte der Zellen wurde auf LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die restlichen Zellen wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und am nächsten Tag ausplattiert.

2.3.3 Die Konjugation von *C. metallidurans*

Um mit Hilfe einer Konjugation Plasmide von *E. coli* S17-I in *C. metallidurans* zu übertragen, wurde zunächst *E. coli* S17-I mit dem gewünschten Plasmid transformiert (Abschnitt 2.3.1). Mittels PCR positiv getestete Klone wurden in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Gleichzeitig wurde *C. metallidurans* in TMM_{NaGluc} angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 30 °C angezogen. Von beiden Kulturen wurden je 200 µl auf eine Nähragar-Platte (23 g/l) ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Von dem zum nächsten Tag gewachsenen Bakterienrasen wurde Zellmaterial mit der Impföse abgenommen und auf eine TMM-Platte mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Die Platte inkubierte bis zu 5 Tage bei 30 °C. Gewachsene Kolonien wurden auf frische Platten ausgestrichen und mittels PCR geprüft.

2.3.4 Integration von Genen in das Chromosom von *E. coli* (nach Choi *et al.*, 2005; Choi und Schweizer, 2006)

Für die Integration von Genen in das Chromosom von *E. coli* wurden elektrokompetente Zellen von *E. coli* BW25113 und ECB178 hergestellt (Abschnitt 2.3.2) und wie unter 2.3.2 beschrieben mit einem pUC18mini-Tn7T-Gm-Derivat sowie dem Helferplasmid pTNS2 transformiert. Die erste Selektion erfolgte auf Gentamicin-haltigen LB-Agarplatten. Um zu testen, ob die Zellen das Plasmid verloren haben, wurden die Transformanden am nächsten Tag auf einer Ampicillin- und einer Gentamicin-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen. Gentamicin-resistente Klone, die sensitiv gegenüber Ampicillin waren, wurden nochmals mittels PCR auf die Integration des gewünschten Gens überprüft. Dafür wurden die Primer AH142 und AH143 für den Test auf Integration von *egfp* verwendet, sowie AH66 und FK431 für die Integration von *atpIp-atpI*.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

Um Proteine von *C. metallidurans* oder *E. coli* zu untersuchen, wurden die Stämme wie zuvor beschrieben in TMM_{NaGluc} oder LB-Medium angezogen (Abschnitt 2.1.1 und 2.1.2). Die gezielte Expression von Proteinen erfolgte, unabhängig von der Herkunft des Proteins, mit Hilfe der pASK-IBA Vektoren oder pRHB152 in *E. coli* BL21 (DE3). In diesem Fall wurden der Kultur bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 200 µg/l Anhydrotetracyclin (IBA GmbH, Göttingen) oder 0,5 mM Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) zugefügt und die Zellen bis zur Ernte weitere 3 h geschüttelt. Für die Reinigung von AtpC erfolgten alle Anzuchtschritte bei 37 °C, für alle anderen Proteine bei 30°C. Die folgenden Abschnitte beschreiben die Proteinreinigung ab der Zellernte sowie die anschließenden Analysen.

2.4.1 Zellernte und Proteinextraktion

Um die Zellen zu ernten, wurden sie dem Kulturvolumen entsprechend mit dem Rotor SLA3000 in der Sorvall® RC 5C Plus Zentrifuge (Thermo Scientific™) mit 7000 rpm für 30 min zentrifugiert oder bei kleineren Volumina in der Zentrifuge Universal 30 RF (Hettich Lab Technology) mit 5000 rpm. Das Pellet wurde in Puffer W (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) mit 1 mM PMSF und 10 µg/ml DNase I resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (bei 70 % mit 80 W in 4 Mal 3 Zyklen von je 30 s Ultraschall und 30 s Abkühlung auf Eis). Zelltrümmer und unaufgeschlossene Zellen wurden für eine Stunde mit 5000 rpm pelletiert. Zur Trennung der löslichen und unlöslichen Fraktion wurde der Überstand für 1 h mit 45000 rpm in der L8-60M Ultrazentrifuge (Beckman

Coulter, USA) zentrifugiert. Um Membranproteine in Lösung zu bringen, wurde das nach der Ultrazentrifugation entstandene Pellet in Puffer W mit 1 % *n*-Dodecyl β -D-maltosid (DDM) aufgenommen und über Nacht rotierend inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Trennung der gelösten von den nicht gelösten Bestandteilen durch Ultrazentrifugation in der Sorvall MX 120+ Mikro-Ultrazentrifuge (Thermo Scientific™) für 30 min bei 45000 rpm. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten ab der Ernte alle Schritte bei 4 °C.

2.4.2 Protein-Reinigung über die *Strep-Tactin*®-Säule

Die Reinigung von Proteinen, die den *Strep*-tag® II besaßen, erfolgte über eine mit *Strep-Tactin*® gefüllte Affinitätschromatografie-Säule nach dem Protokoll der IBA GmbH. Die hier verwendete Angabe Volumen bezieht sich auf das Säulenvolumen. Nachdem die Säule mit 5 Volumen Puffer W äquilibriert wurde, wurde die Probe geladen. Proteine, die nicht an das *Strep-Tactin*® banden, wurden mit 6 Mal einem Volumen Puffer W von der Säule gewaschen. Die übrigen Proteine lösten sich während der Elution durch Zugabe von 6 Mal 0,5 Volumen Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin. Die einzelnen Wasch- und Elutionsschritte wurden einzeln aufgefangen, um die Wascheffizienz sowie die Bindekapazität der Säule für das zu reinigende Protein zu prüfen. Die Proben lagerten bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis. Damit die Säule wiederverwendet werden konnte, wurde das Säulenmaterial mit 15 Volumen Puffer W mit 1 mM 2-(4'-Hydroxy-benzeneazo)benzonsäure regeneriert und in Puffer W bei 4 °C gelagert.

2.4.3 Protein-Reinigung über die Ni-NTA-Säule

Proteine mit einem His-tag wurden mit Hilfe einer Ni-NTA-Affinitätschromatografie-Säule gereinigt, ähnlich der Reinigung über die *Strep-Tactin*®-Säule. Zum Äquilibrieren der Säule wurden 5 Volumen Puffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM NaCl) verwendet. Nach Beladen der Probe wurde die Säule mit je 3 Volumen Puffer A mit 5 mM, 15 mM und 25 mM Imidazol gewaschen. Die Elution des an die Säulenmatrix gebundenen Proteins erfolgte mit 6 Volumen Puffer A mit 500 mM Imidazol. Zuletzt wurde das Säulenmaterial mit 5 Volumen MES-Puffer (20 mM 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure, pH 5,0; 100 mM NaCl) regeneriert und in 20 % [v/v] Ethanol bei 4 °C gelagert.

2.4.4 Pufferwechsel und Konzentration der gereinigten Proteine

Damit alle Proteine im gleichen Puffer gelöst vorlagen, wurde ein Pufferwechsel über eine PD10-Säule (GE Healthcare, Freiburg) vorgenommen. Diese Säule wurde zunächst mit 5 Volumen Puffer E (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 % [v/v] Glycerin) äquilibriert

bevor maximal 2,5 ml Probe geladen wurden. Das Protein wurde mit 8 Mal 0,5 ml Puffer E eluiert und über eine Viva-Spin-Säule (Vivaspin, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) mit einer Porengröße von 10,000 Da konzentriert. Die Viva-Spin-Säule wurde vorbereitet, indem sie mit Puffer E bei 4°C mit 5000 rpm in der Zentrifuge Universal 30 RF zentrifugiert wurde. Im Anschluss daran wurde die Probe geladen und mit den gleichen Einstellungen zentrifugiert bis das gewünschte Probenvolumen erreicht war. Die Protein-Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Mikrotiterplatten nach Bradford (1976). Dafür wurde Roti®-Quant (Roth) zunächst 1:3,75 in H₂O_{dd} verdünnt und je 200 µl der Verdünnung mit 50 µl Probe gemischt. Der Ansatz inkubierte 5 min bei Raumtemperatur und im Anschluss daran wurde die OD₅₉₅ im Tecan infinite M200 gemessen. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Eichgerade von 0-100 µg/ml Albumin Fraktion V (biotinfrei) erstellt.

Neben der Konzentrationsbestimmung nach Bradford wurde auch das NanoDrop®ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, USA) verwendet. Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient des gereinigten Proteins wurden mit dem Programm ProtParam des ExPASy Bioinformatics Resource Portals vorhergesagt (Gasteiger *et al.*, 2005).

2.4.6 Proteintrennung über ein denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel (nach Laemmli, 1970)

Für die Trennung von Proteinen wurden denaturierende SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 6 aufgeführt. Für das Gießen der Minigele wurde die Apparatur von Bio-Rad Laboratories (USA) verwendet, für die großen Gele wurde die Hoefer Electrophoresis Unit SE600 (Amersham Pharmacia Biotech, USA) genutzt.

Die auspolymerisierten Gele wurden in eine Elektrophoresekammer (von BioRad Laboratories für Minigele, von Hoefer für große Gele) eingespannt, welche mit Laemmli-Puffer (2,5 mM Tris; 0,2 M Glyzin; 3,5 mM SDS) gefüllt wurde. Währenddessen wurden die Proteinproben 5:1 mit 5xSDS-Ladepuffer (125 mM Tris-HCl; pH 6,8; 20 g/l SDS; 50 % [v/v] 86 % Glycerin; 0,5 % [v/v] β-Mercaptoethanol; 0,01 g/l Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 95 °C gekocht wenn es sich um ein hydrophiles Protein handelte oder 30 min bei 30 °C inkubiert wenn es ein Membranprotein war. Zellpellets wurden in 2xSDS-Ladepuffer suspendiert und für 10 min bei 95 °C gekocht. Vor dem Beladen der Gele zentrifugierten die Proben 5 min mit 12000 rpm. Es wurden jeweils 25 µg Gesamtproteinextrakt oder 2 µg gereinigtes Protein geladen. Im Anschluss an das Beladen legte man eine elektrische

Stromstärke von 25 mA pro Minigel beziehungsweise eine Spannung von 180 V für große Gele an (Electrophoresis Power Supply – EPS601 von Amersham Biosciences). Die Proben wanderten durch die SDS-Gele bis das Bromphenolblau aus dem Gel lief.

Tab. 6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Komponenten	Trenngel				Sammelgel	
	Großes Gel		Minigel		Großes Gel	Minigel
	7 %	12 %	12,5 %	15 %	5 %	
Rotiphorese Gel 30	7,5 ml	12 ml	2,5 ml	3 ml	3,3 ml	0,33 ml
1,88 M Tris-HCl; pH 8,8	6 ml	6 ml	1,2 ml	1,2 ml	-	-
0,625 M Tris-HCl; pH 6,8	-	-	-	-	4 ml	0,4 ml
0,5 % [w/v] SDS	6 ml	6 ml	1,2 ml	1,2 ml	4 ml	0,4 ml
H ₂ O _{dd}	10,5 ml	10,5 ml	1,1 ml	0,6 ml	8,7 ml	0,87 ml
TEMED	50 µl	50 µl	7,5 µl	7,5 µl	30 µl	3 µl
10 % [w/v] APS	250 µl	250 µl	45 µl	45 µl	75 µl	15 µl

2.4.7 Gewichtstandards für die Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen in SDS-Gelelen

Als Orientierung zur Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen, wurden neben den Proben auch Proteinmarker während der SDS-PAGE getrennt. Verwendet wurde der *PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific; #26630), der nach der Gel-Elektrophorese Banden mit 5, 10, 15, **20**, 30, 40, **50**, 70, **100**, 150 und 250 kDa zeigt. Die fett hervorgehobenen Banden sind höher konzentriert. Vorteil dieses Markers ist, dass die Proteine mit einem *Strep-tag® II* versehen und daher auch nach einem Western Blot mit dem *Strep-tag®*-Antikörper sichtbar sind. Für andere Anwendungen wurde der *Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific, #26619) verwendet, der nach der Gel-Elektrophorese Banden mit **10**, 15, **25**, 35, 55, **70**, 100, 130 und 250 kDa zeigt. Die fett hervorgehobenen Banden sind grün beziehungsweise rot gefärbt, der Rest blau.

2.4.8 Coomassie-Färbung von Proteinen (nach Weber und Osborn, 1969)

Um die im SDS-Polyacrylamid-Gel getrennten Proteine zu färben, wurden sie 2-16 h in Coomassie-Färbelösung (2 g/l Coomassie-Brilliantblau R-250; 0,5 g/l Coomassie-Brilliantblau G-250; 42,5 % [v/v] Ethanol; 5 % [v/v] Methanol; 10 % [v/v] Essigsäure) geschwenkt. Zum Entfernen des nicht an Proteine gebundenen Farbstoffes schwenkten die

Gele bis Erreichen des gewünschten Färbegrades in Entfärber (20 % [v/v] Ethanol (vergällt); 10 % [v/v] Essigsäure).

2.4.9 Western Blot (nach Towbin *et al.*, 1979)

Zur Identifizierung von Proteinen mittels Antikörper, wurden die in einem Polyacrylamid-Gel getrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dafür schwenkte das SDS-Polyacrylamid-Gel zusammen mit der Nitrozellulose-Membran kurz in Towbin-Puffer (25 mM Tris; 0,192 M Glyzin; 20 % [v/v] Methanol). Für den Transfer wurde der Trans-Blot SD (BioRad, München) verwendet, eine Zelle für den halb trockenen Proteintransfer. Auf die Anodenplatte wurden in dieser Reihenfolge ein in Towbin-Puffer getränktes Whatman-Papier (1 mm Schichtdicke), die Nitrozellulose-Membran, das SDS-Polyacrylamidgel und ein weiteres in Towbin-Puffer getränktes Watman-Papier gelegt. Über diesem Stapel wurde die Kathodenplatte festgesteckt und für 40 min eine Spannung von 15 V angelegt. Nach Beendigung des Blottens wurde die Nitrozellulosemembran in Blockierungspuffer (siehe 2.4.10 und 2.4.11) gelegt und gegebenenfalls die Markerbanden mit Bleistift markiert.

2.4.10 Proteinnachweis mittels *Strep-Tactin*®-HRP-Konjugat

Nach einem Western Blot inkubierte die Nitrozellulose-Membran für den Nachweis von Proteinen mit einem *Strep-tag*® II bei 4 °C über Nacht in PBST-Puffer (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄*2H₂O, 115 mM NaCl, 0,5 % Tween 20) und 3 % Bovine Serum Albumin, um nicht mit Protein beladene Bereiche zu blockieren. Nun wurde die Blockierungslösung durch PBST-Puffer ersetzt und die Membran darin 5 min lang mit Hilfe des Plattformschüttlers Rotamax 120 (Heidolph Instruments GmbH) mit 50 rpm geschwenkt. Der Puffer wurde abgossen und der Vorgang zwei Mal wiederholt. Um zu verhindern, dass der Biotin-Carrier detektiert wird, schwenkte die Membran vor Zugabe des *Strep-Tactin*®-HRP-Konjugats (Biorad, München) 10 min in PBST-Puffer mit 0,001 % [w/v] Avidin. Im Anschluss wurde die Membran je 2 Mal für 1 min in PBST- und PBS-Puffer (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄*2H₂O, 115 mM NaCl) gewaschen. Bis zur *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Detektion lagerte die Membran in PBS-Puffer.

2.4.11 Nachweis von *His-tag*, *PhoA* und *LacZ*

Für den Nachweis von Proteinen ohne einen *Strep-tag*® II wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Western Blot bei 4 °C über Nacht in PBST-Puffer mit 5 % Magermilchpulver (Sucofin®) blockiert. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum Waschen schwenkte die Membran drei Mal 5 min in PBST-Puffer. Danach inkubierte die

Membran 1 h mit entsprechend in PBST-Puffer verdünntem primärem Antikörper (Anti-His-Antikörper 1:2500, Anti-PhoA-Antikörper 1:2500, Anti- β -Galaktosidase-Antikörper 1:1000). Der benutzte Antikörper wurde für die weitere Verwendung bei 4°C gelagert. Die Membran wurde erneut drei Mal für 5 min in PBST-Puffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde 1:50000 in PBST-Puffer verdünnt zur Membran gegeben. Gegen den Anti-His-Antikörper wurde der Anti-*Mouse*-Antikörper (Acris Antibodies GmbH, Herford) und gegen die Anti-PhoA- und Anti- β -Galaktosidase-Antikörper der *Goat*-Anti-*Rabbit*-Antikörper (Bio-Rad Laboratories, Inc.) verwendet. Nach 1 h wurde die Membran je 2 Mal mit PBST- und PBS-Puffer gewaschen und lagerte bis zur Detektion in PBS-Puffer.

2.4.12 Chemilumineszenz und Detektion

Um die an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wurde der PBS-Puffer abgossen und durch die kurz zuvor miteinander gemischten Lösungen A (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0; 2,5 mM Luminol; 0,396 mM Coumarsäure) und B (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,08 % [v/v] 30 % H₂O₂) ersetzt. Nach 2-3 min wurde die Membran in eine Folie eingeschlossen und zusammen mit einem Film (Lumi-Film Chemilumineszenz Detektionsfilm, Roche Diagnostics) für 2-15 min in eine Filmkassette gelegt. Zum Entwickeln wurde der Film zunächst in Entwickler (Calbe Chemie GmbH) geschwenkt bis Banden zu sehen waren. Der Entwickler wurde kurz in Wasser abgewaschen und der Film für 1 min in Fixierer (Calbe Chemie GmbH) inkubiert. Der Fixierer wurde wieder mit Wasser abgewaschen und der Film zum Trocknen aufgehängt. Da der Film lichtempfindlich war, wurden alle Schritte in einer Dunkelkammer unter Rotlicht durchgeführt.

2.4.13 Reinigung des Anti- β -Galaktosidase Antikörpers

Um die Spezifität von Antikörpern zu erhöhen, wurden sie mit Zelllysat vermengt. Dafür wurde zunächst eine Vorkultur von *E. coli* BL21 (DE3) oder *C. metallidurans* AE104 angefertigt. Es wurde der Organismus gewählt, von dem die ursprünglich im SDS-Polyacrylamidgel getrennten Proteine stammten und unter den gleichen Bedingungen angezogen. Nach der Zellernte aus 50 ml Hauptkultur wurde das Pellet wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben in 1 ml Puffer W mit 1 mM PMSF und 10 μ g/ml DNase I suspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die großen Zelltrümmer und unaufgeschlossenen Zellen wurden für 1 h bei 4 °C mit 5000 rpm pelletiert und verworfen. Von dem Überstand wurden 0,5 ml in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und zusammen mit 4 μ l Anti- β -Galaktosidase-Antikörper 3 h auf dem Plattformschüttler bei Raumtemperatur mit 100 rpm geschwenkt. Das

Antikörper-Lysat-Gemisch wurde bei 4 °C gelagert oder direkt in entsprechender Verdünnung für den Proteinnachweis eingesetzt.

2.4.14 Der *Pulldown-Assay*

Der Nachweis der Protein-Protein-Interaktion von Strep-AtpI und His-AtpC *in vitro* erfolgte über einen *Pulldown-Assay*. Zur Vorbereitung wurden zunächst Strep-AtpI und His-AtpC getrennt aus *E. coli* BL21 (DE3) gereinigt und in Puffer E (siehe Abschnitt 2.4.4) auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Für das Experiment wurden 80 µl Strep-Tactin bzw. Ni-NTA-Agarose in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Zum Äquilibrieren des Materials wurden 3 Mal 0,5 ml Puffer E zugegeben und das Gefäß 10 Mal invertiert. Damit beim Abnehmen des Überstands kein Säulenmaterial verloren ging, wurden die Ansätze für 20 s in der Tischzentrifuge mit 12000 rpm zentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Nach Zugabe von 20 µg des ersten Proteins inkubierte das Material 2 h unter ständiger Rotation. Nicht gebundenes Protein wurde entfernt, indem der Überstand abgenommen und das Material 2 Mal mit 0,5 ml Puffer E gewaschen wurde. Anschließend an die Zugabe des zweiten Proteins rotierte der Ansatz weitere 2 h. Für die Kontrollen wurden einmal das erste und einmal das zweite Protein durch eine entsprechende Menge an Puffer ersetzt. Um nicht gebundenes Protein wurde durch Waschen des Materials entfernt. *Strep-Tactin*® wurde 6 Mal mit 0,5 ml Puffer E gewaschen, Ni-NTA-Agarose je 3 Mal mit Puffer E mit 5 mM, 15 mM bzw. 25 mM Imidazol in steigender Konzentration. Um die gebundenen Proteine zu eluieren, wurden 80 µl Puffer E mit 2,5 mM Desthiobiotin (bei *Strep-Tactin*®) oder 0,5 M Imidazol (bei Ni-NTA) zum Ansatz pipettiert und 30 min bei 20 °C mit 800 rpm im Thermoblock geschüttelt. Der Überstand wurde bis zur Analyse bei 4 °C gelagert.

2.5 Reporter-Assays und ihre Anwendungen

Dieser Abschnitt beschreibt zunächst die Durchführung der Enzym-Assays einschließlich der Aktivitätsberechnung und anschließend die Erstellung von Plasmiden und die Anzucht der Stämme für die Probenahmen.

2.5.1 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (verändert nach Miller, 1972; Miller, 1992)

Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität beruht auf der Umsetzung von o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG) zu o-Nitrophenol und Galaktose. Entscheidend ist dabei der Grad der Gelbfärbung durch o-Nitrophenol, gemessen bei OD₄₂₀, der bei der Umsetzung durch eine definierte Menge an Probenmaterial während einer bestimmten Zeit entsteht.

2 Materialien und Methoden

Die für die Bestimmung der Aktivität eingefrorenen Proben wurden auf Eis aufgetaut und jeweils in 950 µl Puffer Z (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄) mit 0,05 M β-Mercaptoethanol aufgenommen. Um die Zellmembran zu permeabilisieren wurde der Ansatz mit 50 µl Permeabilisierungspuffer (2,5 g/l Cetyltrimethylammoniumbromid; 5 g/l Natriumdesoxycholat) vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Zugabe der Substratlösung (4 g/l ONPG frisch gelöst in Puffer Z) wurde die Umsetzung von ONPG gestartet. Für die Gewährleistung der Vergleichbarkeit verschiedener Experimente inkubierte der Ansatz bei 30 °C bis eine Gelbfärbung sichtbar wurde. Zum Stoppen der Reaktion wurde die β-Galaktosidase mit Zugabe von 0,5 ml 1 M Na₂CO₃ inaktiviert. Der Ansatz wurde 20 min bei 4 °C mit 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand in eine Küvette überführt und der Grad der Gelbfärbung bei OD₄₂₀ im Spektrophotometer (SmartSpec™ 3000, Bio-Rad Laboratories, Inc.) gemessen. Für den Nullwert wurde das Protokoll mit einem Ansatz ohne Zellmaterial durchgeführt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte mit der Formel

$$\beta - \text{Galaktosidase} - \text{Aktivität [Miller Unit]} = \frac{1000 \times OD(420)}{t \times V \times OD(600)},$$

wobei die Reaktionszeit t in min und das eingesetzte Probenvolumen V in ml angegeben wurde.

Stammten die Proben von *C. metallidurans*, wurde die Aktivität nach der in der Arbeitsgruppe entwickelten Formel in Units (U) pro Trockengewicht berechnet:

$$\beta\text{-Galaktosidase} - \text{Aktivität [U/Trockengewicht]} = 355,6 \mu\text{mol/l} \times \frac{1000 \times OD(420)}{t \times V \times TG}.$$

Dabei setzt sich der Faktor 355,6 µmol/l aus dem molaren Extinktionskoeffizienten von o-Nitrophenol ($\epsilon=4500$ l/mol x cm), der Schichtdicke der Küvetten ($d=1$ cm), dem Quotienten aus Kulturvolumen ($V_K=1$ ml) und Volumen des Reaktionsansatzes ($V_R=1,6$ ml) sowie dem Umrechnungsfaktor 10^6 zusammen. Das Trockengewicht der Zellen (TG) wurde in mg angegeben.

2.5.2 Bestimmung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität (verändert nach Manoil 1991)

Die Ermittlung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität beruht auf der Umsetzung von para-Nitrophenylphosphat (PNPP) zu Phosphat und p-Nitrophenol. Die Konzentration von letzterem lässt sich wegen seiner gelben Farbe bei OD₄₂₀ messen.

Zu Beginn des Experiments wurde Jodacetamid wo erforderlich frisch zu den Puffern zugegeben und die benötigte Menge an Substratlösung hergestellt. Die bei -20 °C gelagerten Proben wurden auf Eis aufgetaut und in 0,5 ml Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0;

2 Materialien und Methoden

10 mM MgSO₄, 1 mM Jodacetamid) aufgenommen. Der Ansatz wurde 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml *Assay*-Puffer (1 M Tris-HCl, pH 8.0; 0,1 mM ZnCl₂; 1 mM Jodacetamid) resuspendiert. Um die Zellmembran zu permeabilisieren wurden 50 µl 0,1 % (w/v) SDS und 50 µl Chloroform zugegeben, die Probe gemischt und erst 5 min bei 37 °C inkubiert, danach 5 min auf Eis. Mit Zugabe von 100 µl Substratlösung (1 M Tris-HCl, pH 8.0; 0,4 % (w/v) PNPP) wurde die Zeitmessung gestartet. Um während Wiederholungen gleichbleibende Bedingungen zu gewährleisten, inkubierte der Ansatz bei 37 °C. Bei Auftreten einer Gelbfärbung oder spätestens nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 120 µl Stopplösung (1 M KH₂PO₄; 0,5 M EDTA, pH 8.0) gestoppt. Bis zur Zentrifugation des Ansatzes (20 min mit 12000 rpm bei 4 °C) wurde die Probe auf Eis gelagert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in eine Küvette überführt und die optische Dichte bei 420 nm gemessen. Für den Nullwert wurde das Protokoll mit einem Ansatz ohne Zellmaterial durchgeführt. Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität erfolgte mit der gleichen Formel, die auch schon für die Ermittlung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität verwendet wurde.

2.5.3 Transkriptionale Reporterfusionen für das Messen der Promotoraktivität

Die Herstellung transkriptionaler Fusionen erfolgte mit Hilfe des Vektors pRS551. Um Aktivitätsverlust zu vermeiden, wurden *E. coli* BW25113 vor jedem Experiment neu transformiert. Für die Anzucht der Stämme wuchsen die Zellen über Nacht bei 37 °C schüttelnd in Medium mit Ampicillin. Die Hauptkultur wurde in 100 ml-Kolben in 10 ml Medium mit Ampicillin auf OD₆₀₀ 0,05 angeimpft. Die Ernte der Proben erfolgte bei OD₆₀₀ 0,5±0,1. Bis zur Bearbeitung lagerten die Pellets bei 20 °C.

Die Ermittlung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten. Dafür wurden die Proben zunächst wie zuvor unter 2.5.1 beschrieben in Puffer Z mit β -Mercaptoethanol resuspendiert und verdünnt. Davon wurden jeweils 190 µl in die Mikrotiterplatten überführt und mit 10 µl Permeabilisierungspuffer versetzt. Die Platte inkubierte 10 min bei 30 °C mit 300 rpm schüttelnd im neoLab Shaker DTS-2 (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH). Die Reaktion wurde mit 20 µl Substratlösung gestartet und nach Gelbfärbung mit 50 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Während dieser Zeit schüttelte die Platte weiterhin bei 30 °C im Schüttler. Die Ansätze wurden vor dem Messen der OD₄₂₀ nicht zentrifugiert. Um die Streuung durch Zelltrümmer mit zu berücksichtigen, wurde zusätzlich die OD₅₅₀ gemessen. Da die OD₄₂₀ proportional zu der OD₅₅₀ [$OD_{420} = 1,75 \times OD_{550}$] ist, wurde zur Berechnung der Aktivität folgende Formel verwendet:

$$\beta - \text{Galaktosidase} - \text{Aktivität [Miller Units]} = \frac{1000 * (OD_{420} - (1,75 * OD_{550}))}{t * V * OD_{600}}$$

2.5.4 Translationale Reporterfusionen für das Messen der Promotoraktivität

Für die Erstellung translationaler Fusionen mit einem Reporter gen wurden Vektoren hergestellt, die auf dem Vektor pBBR1MCS-3 beruhen. Um in der Nähe der MCS (*multiple cloning site*) befindliche Promotoren zu entfernen, wurde der Vektor pBBR1MCS-3 zunächst nach Herstellerprotokoll mit *SspI* und *VspI* verdaut, die DNA über ein Agarosegel getrennt und die gewünschte Bande ausgeschnitten und gereinigt. Um den von *VspI* produzierten Nukleotidüberhang zu entfernen, wurde das Plasmid-Fragment mit 10 x PCR-Puffer 1 (5 µl auf 50 µl Gesamtansatz) und 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase versetzt und 15 min bei 72 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde wieder gereinigt und mit *gfp+* ligiert. Das Reporter gen *gfp+* wurde zuvor vom Vektor pMUTIN-GFP+ mit den Primern AH23 und AH30 amplifiziert und mit *SspI* geschnitten. In dem resultierenden Vektor pECD1555 war das promotorlose *gfp+* entgegengesetzt zum Tetracyclin-Resistenzgen integriert. Zum Austausch des Reporter gens wurde pECD1555 mit *AseI* und *XbaI* geschnitten und mit *lacZ* ligiert. Das Reporter gen wurde zuvor mit den Primern AH100 und AH101 vom Vektor pECD794-1 amplifiziert und mit den gleichen Enzymen verdaut. Der resultierende Vektor pECD1556 und Derivate dieses Vektors wurden für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität der translationalen *lacZ*-Fusionen verwendet. Dabei erfolgte die Anzucht von *E. coli* wie unter 2.5.3 für die Bestimmung der transkriptionalen Aktivität erläutert. Die Anzucht von *C. metallidurans* erfolgte wie unter 2.1.1 aufgeführt. Die Proben von *C. metallidurans* wurden zu unterschiedlichen Zeiten während des Wachstums geerntet. Die Enzymaktivität wurde wie unter 2.5.1 beschrieben ermittelt.

2.5.5 Erstellung der Plasmide und Anzuchtbedingungen für die Proteintopologie

Für die Ermittlung von Anzahl und Orientierung der Transmembrandomänen von *AtpI_{Eco}* wurden die Plasmide von Thomas Pribyl verwendet, die Teil der Plasmidsammlung der AG Nies sind (Tab. 5). Es wurden ausgehend von der RBS am 3'-Ende verkürzte Varianten von *atpI_{Eco}* mit dem 5'-Ende von *lacZ* bzw. einer am 5'-Ende verkürzten Variante von *phoA* fusioniert. Das Wildtypgen von *phoA* besitzt eine Signalsequenz für den Transport des Transkripts ins Periplasma, die in dem hier verwendeten Genfragment fehlte.

Die Expression der Fusionsproteine erfolgte im *E. coli* Stamm CC118. Da das *atpI_{Eco}*-Fusionsgen unter Kontrolle eines T7-Promotors stand, wurde der Stamm CC118 zusätzlich zu dem pECD636-/pECD637-Derivat mit dem Helferplasmid pGP1-2 transformiert, welches das

Gen für die T7-RNA-Polymerase trug. Der Stamm wurde vor jedem Experiment frisch transformiert und über Nacht in LB bei 30 °C geschüttelt. Die Hauptkultur wurde in 10 ml LB mit Ampicillin und Kanamycin auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Wenn die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,5±0,1 erreichten, wurden sie für 20 min bei 42 °C geschüttelt, um die Expression der T7-RNA-Polymerase zu induzieren. Anschließend schüttelten sie für 2 h bei 37 °C bevor jeweils 2 Mal 0,5 ml Probe für die Enzym-Assays (siehe 2.5.1 und 2.5.2) sowie 100 µg Zellen für eine Western Blot-Analyse entnommen wurden. Die Pellets wurden bis zur Durchführung der Enzym-Assays bei -20 °C gelagert. Es wurden mindestens drei verschiedene Anzuchten durchgeführt.

2.5.6 Der *Bacterial Two Hybrid* (BACTH)-Assay (nach Karimova *et al.*, 1998; Karimova *et al.*, 2001; Karimova *et al.*, 2005)

Für die Durchführung der Interaktionsstudien wurden vier Plasmide verwendet, die eine Fusion des zu untersuchenden Proteins mit dem C- oder N-Terminus des T18- oder T25-Fragments ermöglichten. Eine Zusammenfassung der Methode kann in Battesti und Bouveret (2012) nachgelesen werden. Der *cyd* defiziente *E. coli* Stamm BTH101 wurde über die CaCl₂-Methode (Abschnitt 2.3.1) mit allen möglichen Plasmidkombinationen transformiert. Kombiniert wurden Derivate von pUT18 mit pKT25 oder pKNT25 sowie pUT18C mit pKT25 oder pKNT25. Im Anschluss an die Transformation wurden die Zellen auf 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal, 50 µg/ml) und IPTG (0,5 mM) haltigen LB-Agar-Platten ausplattiert, um ein erstes optisches Ergebnis zu erhalten. Als Selektionsdruck dienten Ampicillin und Kanamycin, die ebenfalls in den LB-Agar-Platten enthalten waren. Die Platten wurden für 40 h bei 30 °C inkubiert und anschließend fotografiert.

Um die Interaktionen zu quantifizieren und falsch positive Ergebnisse durch den optischen Test auf X-Gal-haltigen LB-Agarplatten auszuschließen, wurden zusätzlich β-Galaktosidase-Assays durchgeführt. Dafür wurden von den Platten nach 24 h Inkubation bei 30 °C Kolonien zum Animpfen von Kulturen in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) und IPTG (0,5 mM) verwendet. Die Kulturen schüttelten mit 200 rpm bei 30 °C. Nach 16 h wurde die OD₆₀₀ gemessen und je zwei Mal 250 µl Kultur pelletiert. Das Pellet lagerte bis zur Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivitäten (siehe 2.5.1) bei -20 °C. Die Experimente wurden mindestens drei Mal wiederholt.

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde verwendet, um die Lokalisierung von Proteinen innerhalb der Zelle zu visualisieren. Dafür wurde *atpI_{Eco}* am 5'-Ende mit *egfp* fusioniert und *atpB_{Eco}* am 3'-Ende mit *mcherry* und unter Kontrolle des *atp* Promotors nach dem Protokoll von Choi und Schweizer (2006) ins Chromosom integriert (siehe 2.3.4). Die Klonierung der für die Integration verwendeten Plasmide lief in mehreren Schritten ab. Zunächst wurden *atpI_{Eco}* ohne Startcodon und *atpB_{Eco}* ohne Stoppcodon zusammen in den pASK-IBA7plus kloniert. Danach wurden *atpI_{Eco}* und *atpB_{Eco}* mit den Fluorophoren fusioniert. Anschließend wurden der *atp* Promotor sowie die RBS und die ersten 15 bp von *atpI_{Eco}* mit dem N-Terminus von *egfp* fusioniert. Um das Konstrukt in das Chromosom von *E. coli* BW25113 zu integrieren, wurde es gesamt oder in Teilen in den Vektor pUC18mini-Tn7T-Gm kloniert (Abb. 4). Die verwendeten Plasmide und Primer sind in Tab. 4 und Tab. 5 aufgeführt. Die Integration der Konstrukte ins Chromosom wurde mittels PCR bestätigt.

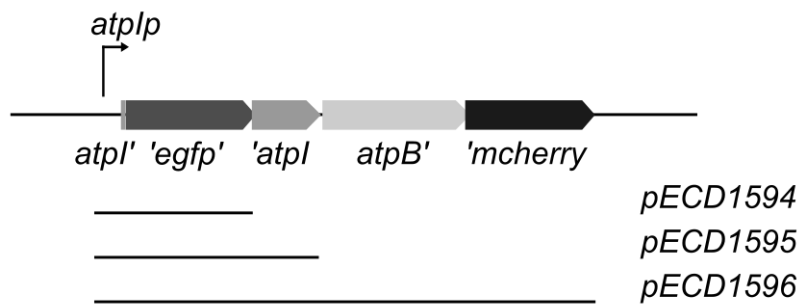


Abb. 4: Konstrukte für die Integration ins Chromosom von *E. coli*.

Die für die Integration ins Chromosom von *E. coli* BW25113 vorbereiteten Konstrukte sind hier schematisch dargestellt. Oben befindet sich der relevante Ausschnitt aus pECD1592, darunter die Bereiche, die in pUC18mini-Tn7T-Gm kloniert wurden.

Die Anzucht der Stämme erfolgte in Flüssigkultur bei 37 °C. Die Hauptkultur wurde mit einer Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und 26 h später Proben für die Mikroskopie entnommen. Die Zellen wurden auf OD₆₀₀ 0,5 verdünnt und 10 µl der Flüssigkultur auf einen mit einem dünnen Agarosefilm (1 % [w/v], in H₂O_{dd} gelöst) überzogenen Objektträger getropft und nach dem Verdunsten des Flüssigkeitsfilms Probe mit einem Deckgläschen abgedeckt und mikroskopiert. Zum Mikroskopieren wurde das Axioskop (Zeiss) mit zugeschalteter Fluoreszenzlampe (Zeiss) und dem Filter I (Exzitation *band-pass* 365 nm/ *Beam Splitter* FT 395 nm/ Emission *long-pass* 397 nm) für eGFP oder Filter II (Exzitation 450-490 nm/ *Beam Splitter* FT 510 nm/ Emission *long-pass* 520 nm) für mCherry genutzt. Das Bild wurde mit Hilfe der AxioCam MRc (Zeiss) übertragen und mit dem Programm AxioVision aufgenommen. Über die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde mit

Hilfe des Programms Fiji (Schindelin *et al.*, 2012, 2015) der Filter *Unsharp Mask* (Radius=20) gelegt. Da alle Objekte mit dem Objektiv Plan-Neofluar (100x/ 1,30 Öl) bei Phasenkontrast 3 betrachtet wurden, wurde vor dem Mikroskopieren ein Tropfen Immersionsöl (Zeiss) auf das Deckgläschen getropft.

2.7 Bioinformatische Analysen

Alle Sequenzen für bioinformatische Analysen stammten von der Datenbank MicrobesOnline (<http://www.microbesonline.org>; Dehal *et al.*, 2010). Die für die Abbildungen in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen entsprechen dem Stand vom Oktober 2016. Für das *Alignment* von *atpI* und *atpB* verschiedener Organismen wurde das Programm CLUSTAL O 1.2.1 (Li *et al.*, 2015; McWilliam *et al.*, 2013; Sievers *et al.*, 2011) verwendet. Die *atpI*-Sequenzen stammten von *E. coli* K12 MG1655 (VIMSS17799), *C. metallidurans* CH34 (VIMSS1775891), *Neisseria meningitidis* 053442 (VIMSS3543548), *Bordetella pertussis* Tohama I (VIMSS514563), *Diaphorobacter* sp. TPSY (VIMSS5786152), *Rhodoferrax ferrireducens* DSM 15236 (VIMSS1270443), *Citrobacter rodentium* ICC168 (VIMSS10401147), *Salmonella typhimurium* LT2 (VIMSS151152), *Enterobacter* sp. 638 (VIMSS3627313), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578 (VIMSS3384621), *Proteus mirabilis* HI4320 (VIMSS5785167), *Serratia proteamaculans* 568 (VIMSS3617942), *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 (VIMSS2079579), *Pseudomonas aeruginosa* PA7 (VIMSS7069244), *Vibrio cholerae* MZO-3 (VIMSS4130673) und *Shewanella oneidensis* MR-1 (VIMSS203823).

Einzelne DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm Clone Manager 9 betrachtet (Scientific & Educational Software). Es wurde verwendet um Schnittstellen zu lokalisieren, Primer zu designen und die Sequenzen der von der Microsynth AG zur Überprüfung sequenzierten Plasmidabschnitte mit den bei MicrobesOnline veröffentlichten Sequenzen zu vergleichen.

Für die Vorhersage der Proteintopologie von *AtpI_{Eco}* (VIMSS17799) wurden die Programme TMHMM 2.0 (Krogh *et al.*, 2001; Sonnhammer *et al.*, 1998), HmmTop 2.0 (Tusnády und Simon, 1998; Tusnády und Simon, 2001), SOSUI/G 1.1 (Hirokawa *et al.*, 1998; Mitaku und Hirokawa, 1999; Mitaku *et al.*, 2002) und MEMSAT-SVM (Jones, 2007; Jones *et al.*, 1994; Nugent und Jones, 2009) verwendet. Weitere Parameter wie das Molekulargewicht, der theoretische Extinktionskoeffizient und die Anzahl geladener und ungeladener Aminosäuren wurden mit dem Programm ProtParam des ExpASy Bioinformatics Resource Portals (Gasteiger *et al.*, 2005) vorhergesagt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Transkription und Translation des *atp*_{Eco}-Operons

Dieses Kapitel beschreibt die Untersuchung der Promotoraktivitäten des *atp*-Operons von *E. coli*. Für die Analysen wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt: Um die transkriptionale Promotoraktivität zu ermitteln, wurde der Promotor vor ein Reporter-gen mit eigener Ribosomenbindestelle (RBS) kloniert. Dieses Vorgehen ermöglicht Rückschlüsse auf die Höhe der Transkription, da die RBS keine Rolle spielt. Mit der translationalen Fusion eines Reporter-gens mit dem zu untersuchenden Gen hingegen ließ sich der Einfluss der natürlichen RBS auf die Translation des jeweiligen Gens bestimmen.

3.1.1 Die Aktivität der *atp* Promotoren von *E. coli* – die transkriptionale Fusion mit *lacZ*

Die Existenz der in *atpI*_{Eco} lokalisierten Promotoren wurde in der Literatur kontrovers diskutiert (Abschnitt 1.1). Daher wurde das Thema hier wieder aufgegriffen und die Aktivitäten sowie der Einfluss der den Promotoren folgenden Stamm-Schleifen-Strukturen erneut in einem einheitlichen System ermittelt. Zusätzlich wurde der nach Computeranalysen postulierte Promotor vor *atpC*_{Eco} experimentell untersucht (Huerta und Collado-Vides, 2003).

Die Analyse der Promotoraktivitäten erfolgte über eine transkriptionale Fusion der Promotoren mit *lacZ* mit Hilfe des Plasmids pRS551. Dabei wurde die Promotorregion ohne RBS vor ein *lacZ*-Gen kloniert, welches einen eigenen Translationsstart und eine eigene RBS besitzt. Zur besseren Anschaulichkeit sind die für die Fusionen verwendeten Regionen in Abb. 5 schematisch dargestellt. Für die Experimente wurde *E. coli* BW25113 verwendet.

Wie in Kasimoglu *et al.* wurden die Promotoraktivitäten während des exponentiellen Wachstums in LB oder Minimalmedien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen oder pH-Werten ermittelt (Kasimoglu *et al.*, 1996). Der Promotor vor dem *atp*_{Eco}-Operon, *atpIp*_{Eco}, war der stärkste Promotor und unterschied sich in der Aktivität nicht von *atpIpatpBp₁Bp₂*_{Eco}, der zusätzlich die innerhalb der kodierenden Sequenz von *atpI*_{Eco} lokalisierten Promotoren enthielt (Abb. 6).

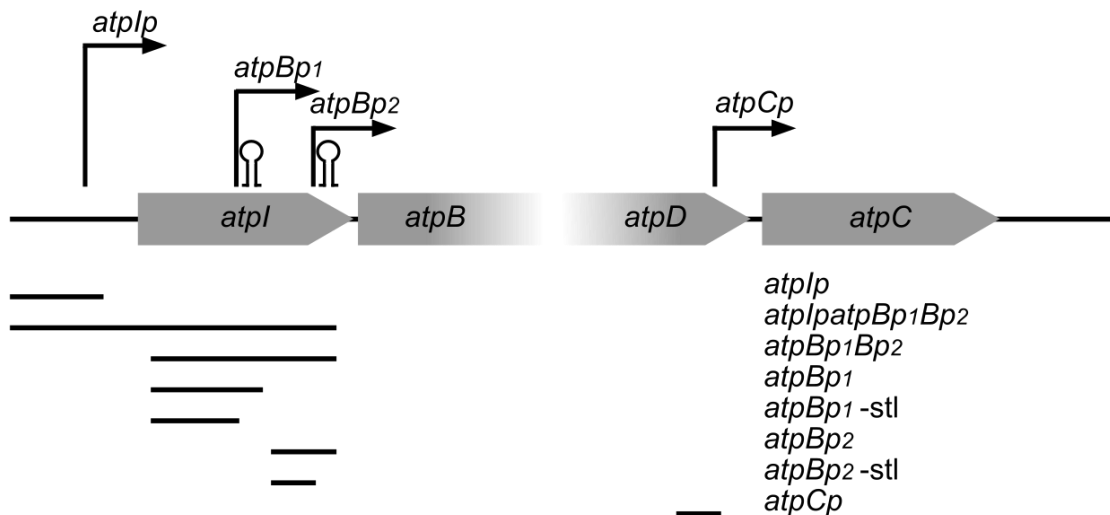


Abb. 5: Schematische Darstellung der für die transkriptionalen Fusionen mit *lacZ* verwendeten Regionen aus *E. coli*.

Die Striche unter dem *atp*-Operon von *E. coli* geben die Regionen an, die für die transkriptionale Fusion mit *lacZ* verwendet wurden. Die schwarzen Pfeile markieren die Position der nachgewiesenen und vorhergesagten Promotoren, die Position der Stamm-Schleifen-Strukturen ist durch ein Piktogramm (Ω) dargestellt. Die Abkürzung *-stl* verweist auf das Fehlen der ausgewiesenen Stamm-Schleifen-Strukturen in der jeweiligen Region.

Anschließend wurden sowohl die Aktivität von *atpBp1Bp2Eco* sowie die Einzelaktivitäten der möglichen Promotoren gemessen. Da auf *atpBp1Eco* und *atpBp2Eco* eine Stamm-Schleifen-Struktur mit einer möglichen RNase E-Schnittstelle folgt (McCarthy *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1984; Schaefer *et al.*, 1989; Abb. 2), wurden ihre Einzelaktivitäten zusätzlich mit Konstrukten ohne die jeweilige Stamm-Schleifen-Struktur gemessen, um deren Einfluss auf die Expression zu testen. In Abb. 6 ist zu sehen, dass *atpBp1Bp2Eco* mit 11070 *Miller Units* nur 2,5 % der Promotoraktivität von *atpIpEco* besaß. Betrachtet man jedoch die Aktivitäten von *atpBp1Eco* und *atpBp2Eco* getrennt voneinander, so sieht man, dass sie sich nicht addierten, sondern dass ihre kombinierte Aktivität nicht höher war als die individuellen Werte von 8487 beziehungsweise 10424 *Miller Units*. Entfernte man die Stamm-Schleifen-Strukturen abwärts der Promotoren, stiegen die Aktivität von *atpBp1Eco* und *atpBp2Eco* signifikant an. Dabei erreichte *atpBp1Eco-stl* etwa die gleiche Aktivität und *atpBp2Eco-stl* eine 1,8-fach höhere als das *atpBp1Bp2Eco*-Konstrukt. Die Aktivität des Promotors *atpCpEco* betrug das 0,19-fache der Aktivität von *atpBp1Bp2Eco*, ist jedoch 10 Mal höher als die Negativkontrolle (Abb. 6).

3 Ergebnisse

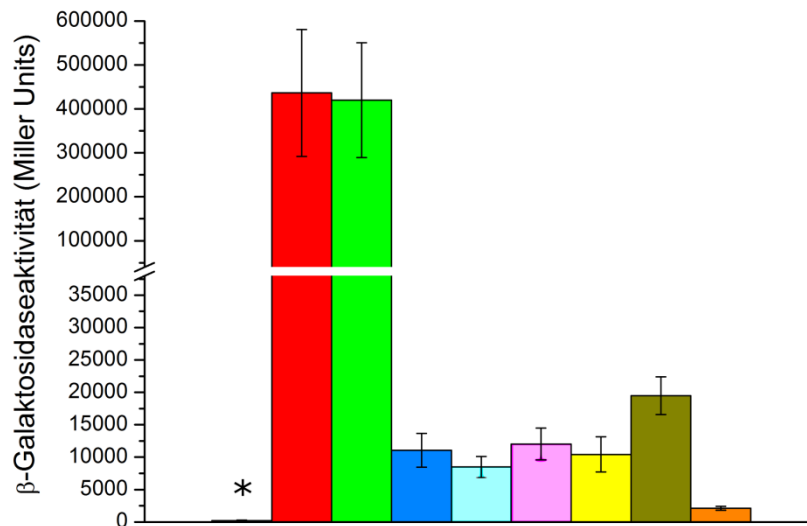


Abb. 6: Aktivitäten der Promotoren des *atp_{Eco}*-Operons.

E. coli BW25113 mit pRS551 oder pECD1278-pECD1285 wurde bei 37 °C angezogen und Proben für die Ermittlung der β -Galaktosidase-Aktivitäten bei Erreichen der OD₆₀₀ von 0,5±0,1 genommen. Die Plasmide kodierten jeweils für *lacZ* unter Kontrolle eines Promotors (*grau), *atpIp_{Eco}* (rot), *atpIpatpBp₁Bp_{2Eco}* (hellgrün), *atpBp₁Bp_{2Eco}* (blau), *atpBp_{1Eco}* (hellblau), *atpBp_{1Eco}-stl* (pink), *atpBp_{2Eco}* (gelb), *atpBp_{2Eco}-stl* (oliv) oder *atpCp_{Eco}* (orange). Die Abkürzung *-stl* hinter dem Promotor steht für die Abwesenheit von Stamm-Schleifen-Strukturen. Die Abweichungen von mindestens fünf Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

Um den Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Promotoraktivitäten zu testen, wurde *E. coli* BW25113 mit den entsprechenden Plasmiden in TMM-Medium mit Glukose, Natrium-Succinat oder Glycerin angezogen. Zur besseren Lesbarkeit wurden die Medien im Folgenden entsprechend mit TMM_{Gluc}, TMM_{Succ} und TMM_{Glyc} abgekürzt. Anzucht, Ernte und Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgten wie zuvor beschrieben (Abschnitt 2.5.3). Die Ergebnisse sind in Abb. 7 A und Abb. 8 A zusammengefasst.

Vergleicht man zunächst nur *atpIp_{Eco}* und *atpIpatpBp₁Bp_{2Eco}*, erkennt man einen deutlichen Unterschied in der Promotor-Aktivität wenn die Zellen in TMM_{Gluc}, TMM_{Succ} oder TMM_{Glyc} angezogen wurden. In TMM_{Gluc} war ihre Aktivität am höchsten. In TMM_{Succ} und TMM_{Glyc} erreichte sie mit einer Ausnahme die gleiche Aktivität. Mit Succinat als Kohlenstoffquelle war die Aktivität von *atpIp_{Eco}* niedriger. Der Unterschied ist aber höher als die von *atpBp₁Bp_{2Eco}* gemessene Aktivität (Abb. 7 B) und die Standardabweichung ist für *atpIpatpBp₁Bp_{2Eco}* sehr hoch (Abb. 7 A).

3 Ergebnisse

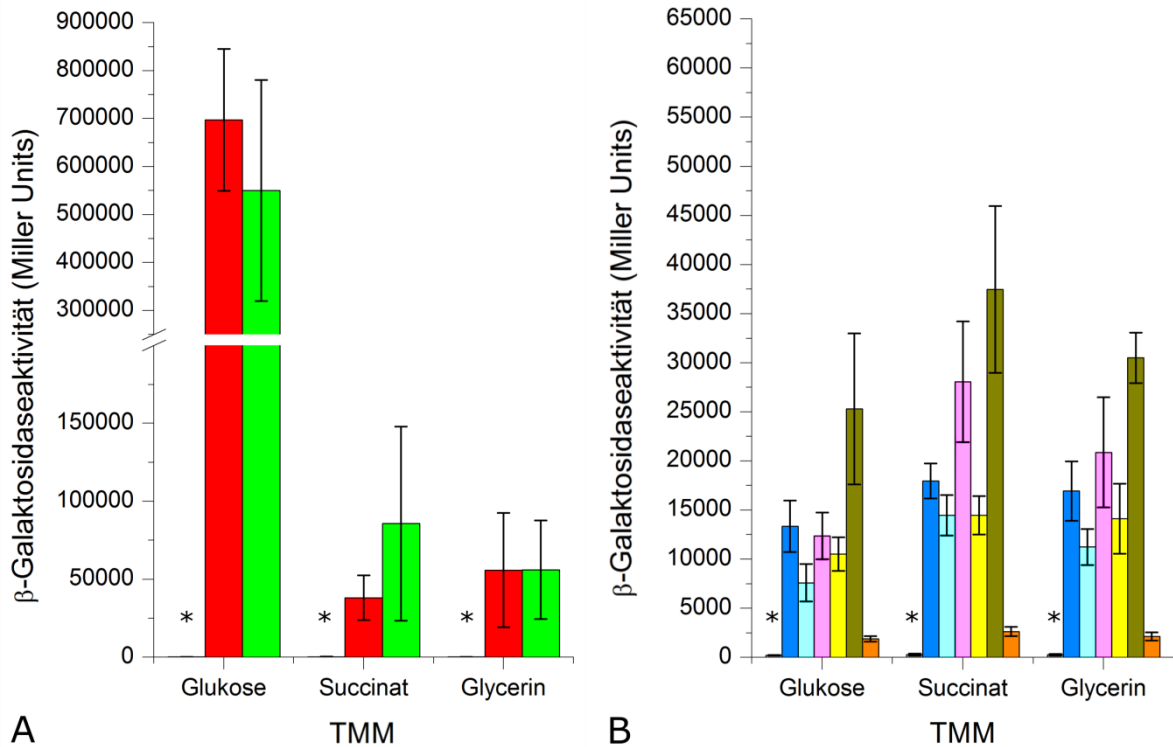


Abb. 7: Einfluss der C-Quelle auf die Aktivitäten der Promotoren des *atp_{Eco}*-Operons.

Für die Versuche wurde *E. coli* BW25113 mit pRS551 oder pECD1278-pECD1285 verwendet. Die Plasmide kodierten für *lacZ* unter Kontrolle eines Promotors (*grau), (A) *atpIp_{Eco}* (rot) und *atpIpBp₁Bp_{2Eco}* (grün), sowie (B) *atpBp₁Bp_{2Eco}* (blau), *atpBp_{1Eco}* (hellblau), *atpBp_{1Eco-stl}* (pink), *atpBp_{2Eco}* (gelb), *atpBp_{2Eco-stl}* (oliv) oder *atpCp_{Eco}* (orange). Die Transformanten wurden in TMM-Medium mit pH 7,0 und den C-Quellen Glukose, Natrium-Succinat oder Glycerin angezogen. Die Proben für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden jeweils bei Erreichen der OD_{600} von $0,5 \pm 0,1$ geerntet. Die Abweichungen von mindestens drei Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

Untersuchte man *atpBp_{1Eco}* und *atpBp_{2Eco}*, blieben die Verhältnisse der Aktivitäten untereinander bei Wachstum in jeweils einer der Kohlenstoffquellen gleich. Die Aktivität von *atpBp_{1Eco}* betrug jeweils das 0,6-0,8-fache beider Promotoren zusammen, wobei ohne die Stamm-Schleifen-Struktur eine 1,6-1,9-fach höhere Aktivität gemessen wurde als mit. Für *atpBp_{2Eco}* glichen sich die Verhältnisse deutlicher. Die Aktivität für *atpBp_{2Eco}* betrug das 0,79- bis 0,83-fache der Gesamtaktivität von *atpBp₁Bp_{2Eco}*, ohne die Stamm-Schleifen-Struktur hingegen das 1,8- bis 2-fache (Abb. 7 B).

Verglich man den Einfluss der verschiedenen Kohlenstoffquellen auf die Aktivitäten der einzelnen Promotoren waren geringe Unterschiede zu erkennen. Die Promotoraktivitäten von *atpBp_{1Eco}* und *atpBp_{2Eco}* mit und ohne Stamm-Schleifen-Struktur waren in TMM_{Succ} höher als in TMM_{Gluc} . Gegenüber dem Wachstum in TMM_{Gluc} war nur die Aktivität von *atpBp_{2Eco-stl}* in TMM_{Glyc} nicht erhöht und gegenüber TMM_{Glyc} nur die Aktivitäten von *atpBp₁Bp_{2Eco}* und

3 Ergebnisse

atpBp_{2Eco} bei Wachstum in TMM_{Succ}. Insgesamt unterschieden sich die Aktivitäten um maximal einen Faktor von 2 (Abb. 7 B).

Auch die Aktivität von *atpCp_{Eco}* war in TMM_{Succ} höher als in TMM_{Gluc} und TMM_{Glyc}, aber um weniger als das Zweifache. Bei Wachstum in TMM_{Gluc} und TMM_{Glyc} bestand kein Unterschied in der Aktivität von *atpCp_{Eco}* (Abb. 7 B).

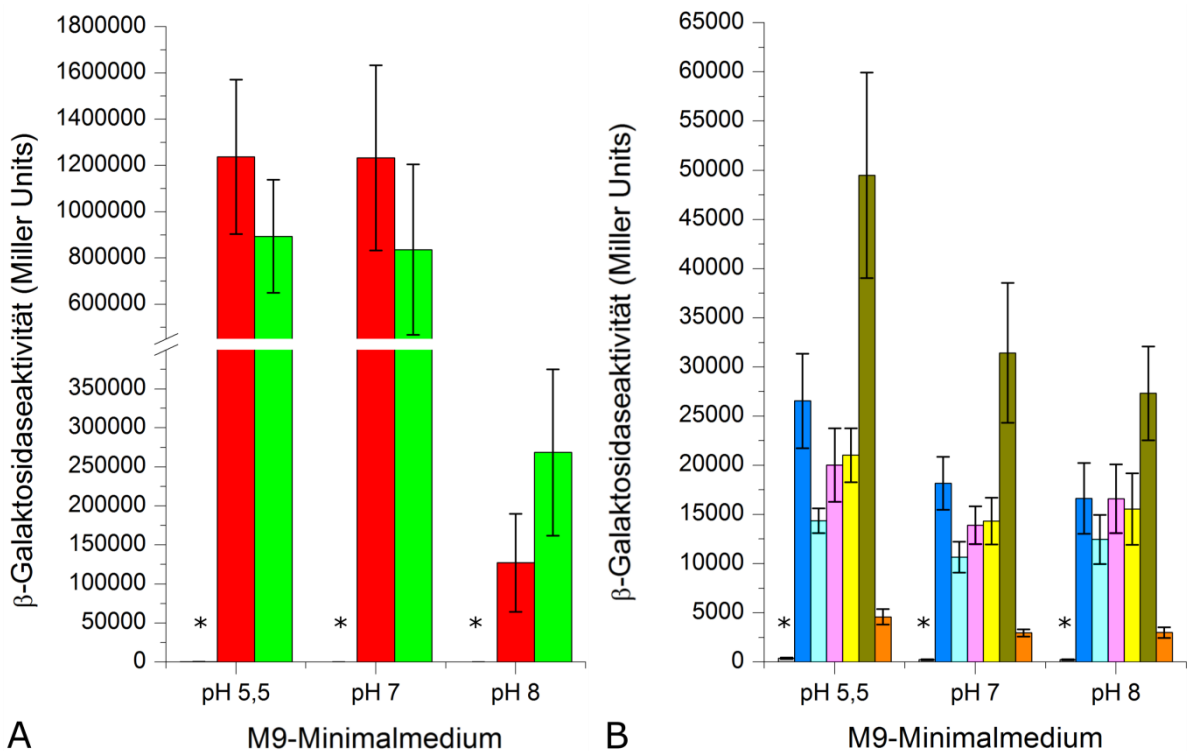


Abb. 8: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivitäten der Promotoren des *atp_{Eco}*-Operons. Für die Versuche wurde *E. coli* BW25113 mit pRS551 oder pECD1278-pECD1285 verwendet. Die Plasmide kodierten für *lacZ* unter Kontrolle keines Promotors (*grau), (A) *atpIp_{Eco}* (rot) und *atpIpatpBp₁Bp_{2Eco}* (grün), sowie (B) *atpBp₁Bp_{2Eco}* (blau), *atpBp_{1Eco}* (hellblau), *atpBp_{1Eco-stl}* (pink), *atpBp_{2Eco}* (gelb), *atpBp_{2Eco-stl}* (oliv) oder *atpCp_{Eco}* (orange). Die Abkürzung *-stl* hinter dem Promotor steht für die Abwesenheit von Stamm-Schleifen-Strukturen. Der Einfluss des pH-Wertes mit Glukose als Kohlenstoffquelle wurde durch Anzucht in M9-Minimalmedium mit pH 5,5; pH 7,0 oder pH 8,0 ermittelt. Die Proben für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden jeweils bei Erreichen der OD₆₀₀ von 0,5±0,1 geerntet. Die Abweichungen von mindestens drei Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

Neben dem Einfluss der Kohlenstoffquelle wurde auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Promotoraktivitäten ermittelt. Dafür wurden die Zellen in gepufferten M9-Minimalmedium mit Glukose und pH 5,5; 7,0 oder 8,0 angezogen. Die Ergebnisse für die β -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Abb. 8 dargestellt. Die Promotoraktivitäten für *atpIp_{Eco}* und *atpIpatpBp₁Bp_{2Eco}* waren in pH 5,5 und pH 7,0 gleich, wobei *atpIpatpBp₁Bp_{2Eco}* jeweils eine geringere Aktivität als *atpIp_{Eco}* aufwies. Letzteres kehrte sich bei pH 8,0 um. Dort waren die

3 Ergebnisse

Aktivitäten auch insgesamt geringer als in M9-Minimalmedium pH 5,5 und pH 7,0 (Abb. 8 A).

Betrachtete man die Promotoren innerhalb der Sequenz von *atpI_{Eco}* ergab sich ein anderes Bild. Mit Ausnahme von *atpBp_{1Eco}* mit und ohne Stamm-Schleifen-Struktur waren die Promotoraktivitäten in M9-Minimalmedium pH 7,0 und 8,0 um weniger als die Hälfte niedriger als in Medium mit pH 5,5. Zwischen pH 7,0 und 8,0 gab es keine Unterschiede. Untersuchte man die Verhältnisse der Promotoraktivitäten von *atpBp_{1Eco}* und *atpBp_{2Eco}* untereinander zeigte sich wieder ein ähnliches Ergebnis wie schon beim Wachstum in LB-Medium und TMM mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Die Aktivität des *atpBp_{1Eco}* betrug das 0,54- bis 0,75-fache von *atpBp_{1Eco}*/*atpBp_{2Eco}* und ohne die Stamm-Schleifen-Struktur das 0,75- bis 1-fache. Die Aktivität des *atpBp_{2Eco}* betrug das 0,8- bis 0,94-fache der Aktivität beider Promotoren und ohne die Stamm-Schleifen-Struktur das 1,75- bis 2,35-fache (vergl. Abb. 6-Abb. 8).

Die Aktivitäten des *atpCp_{Eco}* in M9-Minimalmedium pH 5,5 waren um weniger als das Doppelte höher als in Medium mit pH 7,0 und pH 8,0. Zwischen den Aktivitäten bei pH 7,0 und 8,0 bestand kein Unterschied in der Höhe (Abb. 8 B).

Insgesamt waren die Aktivitätsunterschiede der Promotoren unter den verschiedenen Anzuchtbedingungen sehr gering. Eine Ausnahme waren nur *atpIp_{Eco}* und *atpIp_{Eco}*/*atpBp_{1Eco}*/*atpBp_{2Eco}*, die bei pH 8,0 sowie Natrium-Succinat und Glycerin als C-Quelle deutlich geringere Aktivitäten zeigten. Bei *atpIp_{Eco}* handelte es sich um den stärksten Promotor, dessen Aktivität nicht durch die schwächeren Promotoren innerhalb von *atpI* beeinflusst wurde. Die Promotoren *atpBp_{1Eco}* und *atpBp_{2Eco}* selbst unterschieden sich in ihrer Aktivität nicht voneinander, die Stamm-Schleifen-Struktur nach *atpBp_{2Eco}* hatte aber einen negativen Einfluss auf dessen Aktivität. Ohne die Stamm-Schleifen-Struktur war die Aktivität von *atpBp_{2Eco}* vor allem bei pH 8,0 sowie Natrium-Succinat als C-Quelle erhöht. Die geringste, signifikante Aktivität wies der *atpCp_{Eco}* auf.

3.1.2 Die Translationseffizienz der ersten Gene des *atp_{Eco}*-Operons

Die Messungen der Promotoraktivitäten mit Hilfe der transkriptionalen Fusionen mit *lacZ* haben gezeigt, dass der Promotor vor *atpI_{Eco}* der stärkste innerhalb des *atp_{Eco}*-Operons ist. Die Stöchiometrie der Proteine im fertigen Komplex der F₁F₀-ATPase ist aber unterschiedlich (Ballhausen *et al.*, 2009; Foster und Fillingame, 1982; Jiang *et al.*, 2001; Lünsdorf *et al.*, 1984) und zur Stöchiometrie von AtpI_{Eco} gegenüber den Untereinheiten der F₁F₀-ATPase

3 Ergebnisse

existieren widersprüchliche Ergebnisse (Brusilow *et al.*, 1983; Solomon *et al.*, 1989). Um das Verhältnis von $AtpI_{Eco}$ gegenüber $AtpB_{Eco}$ und $AtpE_{Eco}$ zu klären, wurden hier translationale Fusionen mit Reportergenen durchgeführt.

In die für dieses Experiment hergestellten Vektoren pECD1555 und pECD1556 wurden Fragmente von 181 bp stromaufwärts des Startcodons von $atpI_{Eco}$ bis 15 bp in die kodierende Sequenz von $atpI_{Eco}$, $atpB_{Eco}$ und $atpE_{Eco}$ kloniert. Dies diente der Messung des Einflusses von Promotor, RBS und vor oder in unmittelbarer Nähe des Startcodons befindlicher regulatorischer Elemente auf Expression und Synthese des Zielgens und -proteins. Da sich innerhalb der kodierenden Sequenz von $atpI_{Eco}$ zwei Promotoren mit anschließenden Stamm-Schleifen-Strukturen befinden, wurde für die Fusion mit $atpI_{Eco}$ ein zweites Konstrukt hergestellt, das 372 bp von $atpI_{Eco}$ mit dem Reporter gen verband.

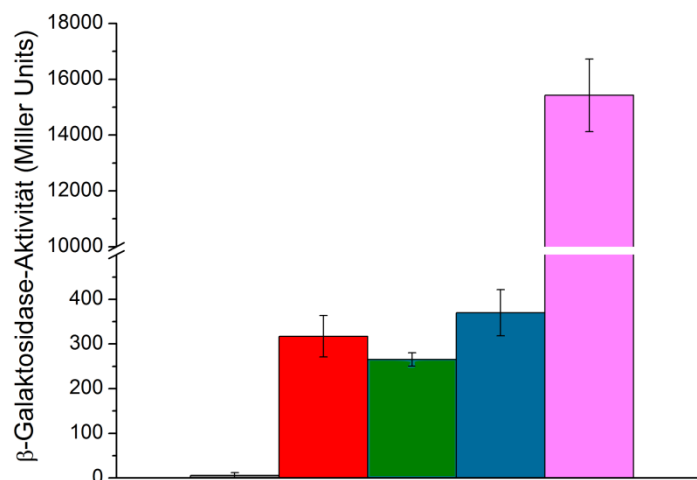


Abb. 9: β-Galaktosidase-Aktivitäten der translationalen Fusionen mit $lacZ$.

Für die Experimente wurde *E. coli* BW25113 mit pECD1556-pECD1560 verwendet. Die Plasmide kodierten für $lacZ$ unter Kontrolle eines Promotors (grau) bzw. $atpI15_{Eco}$ - $lacZ$ (rot), $atpI372_{Eco}$ - $lacZ$ (grün), $atpI-atpB15_{Eco}$ - $lacZ$ (blau) oder $atpI-atpE15_{Eco}$ - $lacZ$ (pink) unter Kontrolle des $atpI_{Eco}$. Die Transformanten wurden in LB-Medium angezogen und bei OD_{600} $0,5 \pm 0,1$ für die experimentelle Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivitäten geerntet. Die Abweichungen von mindestens vier Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

Für die Ermittlung der β-Galaktosidase-Aktivitäten wurde *E. coli* BW25113 mit den Plasmiden pECD1556-pECD1560 wie unter Abschnitt 2.5.4 beschrieben angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, um die Aktivitäten zu bestimmen. Die Aktivität von $AtpI15_{Eco}$ - $LacZ$ betrug 317 *Miller Units*, die für $AtpI372_{Eco}$ - $LacZ$ und $AtpB15_{Eco}$ - $LacZ$ waren demgegenüber um 16 % geringer bzw. höher. Im Gegensatz dazu betrug die β-Galaktosidase-Aktivität von $AtpE15_{Eco}$ - $LacZ$ das 49-fache der Aktivität von

AtpI15_{Eco}'-LacZ (Abb. 9). Die β -Galaktosidase-Aktivitäten entsprechen deutlicher den Erwartungen und daher wurde pECD1556 ebenfalls als Ausgangsplasmid für die Untersuchung der Promotoren des *atp*-Operons von *C. metallidurans* verwendet.

In Kapitel 3.1 wurde gezeigt, dass das *atp*_{Eco}-Operon unter Kontrolle eines starken, vor *atpI*_{Eco} lokalisierten Promotors steht, dessen Aktivität durch die C-Quelle und den pH-Wert beeinflusst wird. Auf die anderen untersuchten Promotoren hatten die veränderten Anzucht-Bedingungen keine Wirkung, aber die Anwesenheit von Stamm-Schleifen-Strukturen. Letztere beeinflussen aber nicht die Synthese von AtpI_{Eco}. Die Ergebnisse zeigen, dass AtpI_{Eco}'-LacZ in der gleichen Menge synthetisiert wird wie AtpB15_{Eco}'-LacZ und in geringeren Mengen als AtpE15_{Eco}'-LacZ.

3.2 *atpI* und das *atp*-Operon von *C. metallidurans*

Im *atp*-Operon von *C. metallidurans* sind die Gene in der gleichen Reihenfolge angeordnet wie in *E. coli*. Unterschiede bestehen unter anderem in der Länge von *atpI*_{Cmet} sowie dem intergenischen Bereich zwischen *atpI*_{Cmet} und *atpB*_{Cmet} (VIMSS1775891: 3791485-3792024 und VIMSS1775890: 3790381-3791250). In dieser Arbeit sollte zunächst gezeigt werden, ob *atpI*_{Cmet} zum *atp*_{Cmet}-Operon gehört und sein Startcodon richtig annotiert wurde. Ebenso sollte geprüft werden, ob sich in dem intergenischen Bereich zwischen *atpI*_{Cmet} und *atpB*_{Cmet} ein Promotor befindet.

3.2.1 Die Identifizierung des Startcodons von *atpI*_{Cmet}

Ein Sequenzvergleich von AtpI_{Eco} mit AtpI_{Cmet} zeigte sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf. Die Ergebnisse des TMHMM Servers ergaben, dass es sich bei beiden Proteinen um Membranproteine mit vier Transmembrandomänen handelt, die aus etwa der gleichen Anzahl an Aminosäuren zusammengesetzt sind. Die N- und C-Termini sind mit einer hohen Wahrscheinlichkeit im Zytoplasma lokalisiert. Für *E. coli* war diese Vorhersage aber nicht eindeutig, da die Termini mit einer Wahrscheinlichkeit von fast 30 % im Periplasma lokalisiert sein könnten. Die Länge des N-terminalen Bereichs vor der ersten Transmembrandomäne von AtpI_{Eco} wurde mit 9 Aminosäuren vorhergesagt, die von AtpI_{Cmet} betrug 71 Aminosäuren (Abb. 10).

3 Ergebnisse

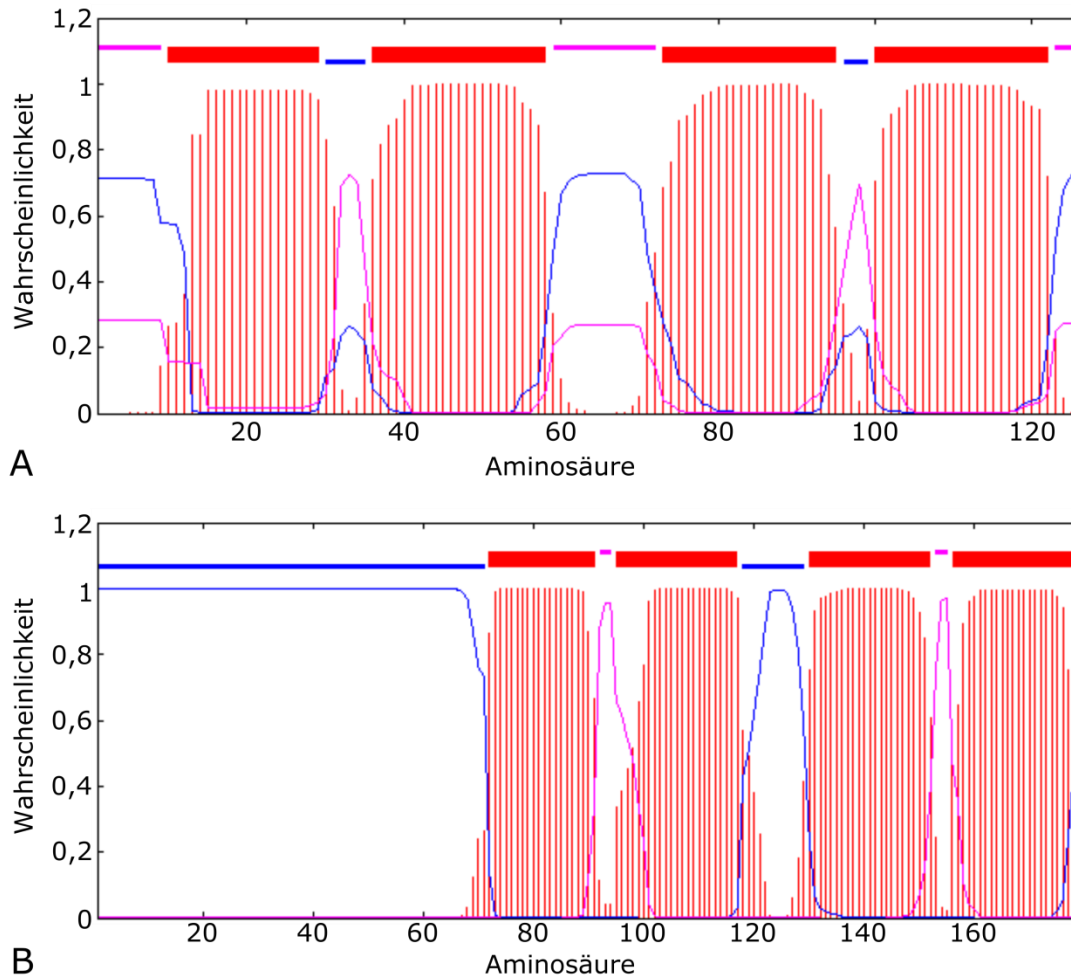


Abb. 10: Vorhersage der Topologie von AtpI.

Die Ergebnisse des TMHMM Server 2.0 geben an, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich eine Aminosäure aus der Sequenz von AtpI_{Eco} (A) und AtpI_{Cmet} (B) im Zytoplasma (blau), Periplasma (pink) oder innerhalb der Membran (rot) befindet. Zwischen der Wahrscheinlichkeit von 1 und 1,2 ist die Vorhersage mit der höchsten Wahrscheinlichkeit angezeigt.

In AtpI_{Cmet} ist ein Großteil der geladenen Aminosäuren innerhalb dieser ersten 71 Aminosäuren lokalisiert. Der Rest des Proteins besteht wie AtpI_{Eco} zu einem hohen Anteil aus ungeladenen Aminosäuren (90,5 % ungeladene AS in AtpI_{Eco}, 89,8% ungeladene AS in 'AtpI_{Cmet} ohne die ersten 71 AS, Expsy ProtParam, Gasteiger *et al.*, 2005). Ein weiterer Blick auf die Aminosäure- und DNA-Sequenz zeigte, dass in diesem hydrophilen Abschnitt zwei Valine durch das Basentriplet GTG kodiert werden, welches neben ATG als Translationsstart dienen kann (Clark und Marcker, 1966; Reddy *et al.*, 1985). Auch das als Startcodon von AtpI_{Cmet} annotierte Basentriplet ist ein GTG. Das nach dem Startcodon zweite durch GTG kodierte Valin (Abb. 11 grün) wurde in der mit Clustal Omega erstellten Vorhersage auf Höhe der dritten Aminosäure von AtpI_{Eco} ausgerichtet (Abb. 11).

3 Ergebnisse

```

Eco      -----MSVSL-----
Cmet     MVRDRQQDRSQAGKASGNDRRDERQQDVRDDDDWDDSAEREEVAVDPLSHAEA VKLLGER
                                         :*. *

Eco      ---VSRNVARKLLLVQLLVVIASGL---LFSLKDPFWGVSAISGGLAVFLPNVLFMIFAW
Cmet     ALRPSRMTPGKVVLAQVAVTLLSALAWAIFAHEHAPSGWSALFGGMVCVVPSPGFFALRLW
          ** . *::*.*: *.: *.* :*: :. * **: **:.. :*. :* : *

Eco      RHQAHTPAKGRVAWTFAFGEAFKVLAMLVLLVVALAV-LKAVFLPLIVTWVLVLLVQILA
Cmet     MSRRQPTVGGLV-----AGEAIKVFSTVALFVLVVVLYRDLRWIPMLVTFLLVLKTYWVA
          : : . * *      ***:*:*: :.*:*::: . :*:**:*:* . :*

Eco      PAVINNKG
Cmet     LAIR----
          * :

```

Abb. 11: Multiple sequence alignment von AtpI_{Eco} (Eco) und AtpI_{Cmet} (Cmet).

Die Abb. wurde mit Hilfe des CLUSTAL O 1.2.1 Servers (Sievers *et al.*, 2011; McWilliam *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015) erstellt. Die möglichen Startpositionen von AtpI_{Cmet} sind fett und rot oder grün hervorgehobenen. Die Symbole unter den Sequenzen geben Positionen mit vollständig konservierten (*), sowie sehr (:) oder schwach (.) ähnlichen AS an.

Sollte der Start von AtpI_{Cmet} falsch annotiert sein, wäre das Protein in Länge seiner Aminosäuresequenz (Abb. 11) und vorhergesagten physikalischen Eigenschaften (Abb. 10) AtpI_{Eco} ähnlicher. Daher war es notwendig den korrekten Start von AtpI_{Cmet} experimentell zu identifizieren. Hierzu wurde der Bereich 400 bp stromaufwärts des annotierten Startcodons bis einschließlich der möglichen Startpunkte von *atpI_{Cmet}* bis Basenpaar 3 (pECD1578), 84 (pECD1579) oder 162 (pECD1580) unter Verwendung des Vektors pECD1556 translational mit *lacZ* fusioniert. Für die Expression der Fusionen wurden die Plasmide zunächst über Konjugation in *C. metallidurans* AE104 eingeführt. Die Fusionsproteine wurden in der SDS-PAGE getrennt und über einen Western Blot mit anschließender Immunodetektion mit gereinigtem Anti-β-Galaktosidase-Antikörper identifiziert.

3 Ergebnisse

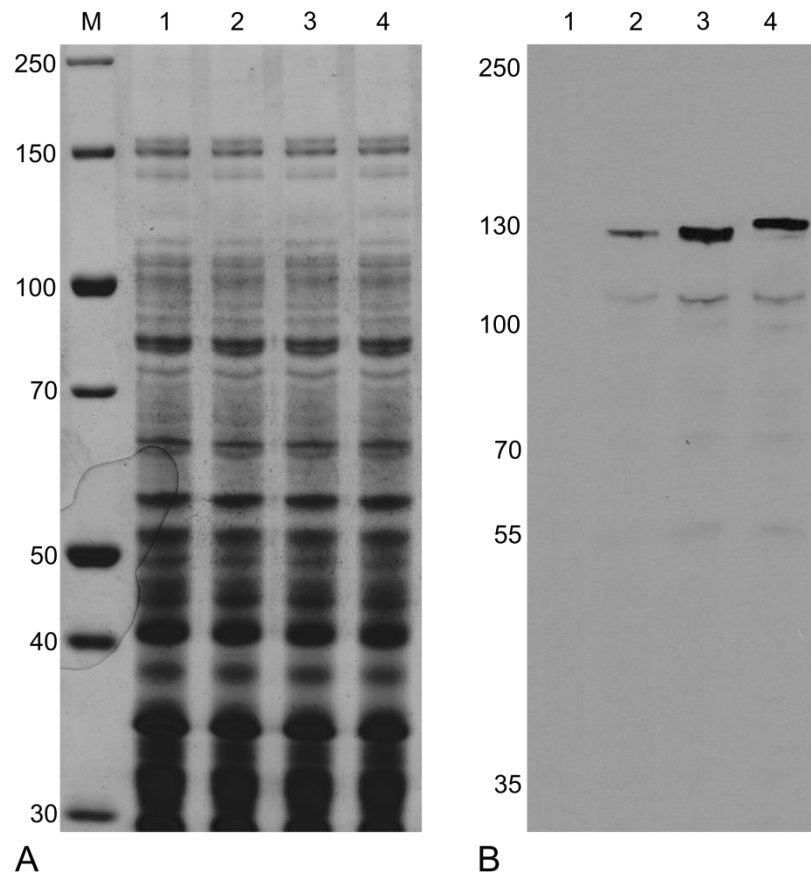


Abb. 12: Die Ermittlung des Startcodons von $AtpI_{Cmet}$.

Die Trennung des Gesamtzellextrakts (je 100 μ g Trockengewicht) der während der exponentiellen Wachstumsphase geernteten Zellen von *C. metallidurans* mit pECD1556 (1), pECD1578 (2), pECD1579 (3), pECD1580 (4) erfolgte über eine SDS-PAGE mit 7 %igem Trenngel. Als Marker (M) wurde der *PageRuler™ Broad Range Unstained Protein Ladder* verwendet. Die Plasmide kodierten für *lacZ* unter Kontrolle keines Promotors (1), sowie *atpI_{Cmet}3'-lacZ* (2), *atpI_{Cmet}84'-lacZ* (3) oder *atpI_{Cmet}162'-lacZ* (4) unter Kontrolle des Promotors vor dem *atp_{Cmet}*-Operon. (A) Die Proteine wurden mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. (B) Die Identifizierung der Fusionsproteine erfolgte über eine Immunodetektion mit dem Anti- β -Galaktosidase-Antikörper. Der hier verwendete *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* wurde von dem Antikörper nicht erkannt und daher schon zuvor auf der Nitrozellulose-Membran direkt nach dem Western Blot markiert.

In der ersten Spur nach dem Marker sieht man die Probe der Transformante mit pECD1556, die im Western Blot erwartungsgemäß kein Signal zeigte, da *lacZ* nicht unter Kontrolle eines Promotors stand. In den Extrakten der Transformanten mit pECD1578-pECD1580 hingegen erkennt man auf Höhe um 130 kDa jeweils eine Bande, die der Masse der β -Galaktosidase-Fusionsproteine entspricht. Die Höhe der Bande stieg mit zunehmender Länge des Konstrukts, was darauf hinweist, dass der annotierte Translationsstart bei der Synthese der Proteine verwendet wurde (Abb. 12).

3 Ergebnisse

Neben der SDS-PAGE und dem Western Blot wurde auch die β -Galaktosidase-Aktivität der Fusionsproteine bestimmt. Dafür wurden die gleichen Transformanten in TMM mit Natrium-Gluconat (TMM_{NaGluc}) angezogen und während des Wachstums Proben für die Durchführung des β -Galaktosidase-Assays entnommen.

Alle Proteine zeigten von der exponentiellen Phase bis hin zur stationären Phase β -Galaktosidase-Aktivität. Dies bestätigt, dass die Translation vom annotierten Startcodon erfolgt. Ein Vergleich der Proben untereinander zeigte, dass die Enzymaktivitäten mit der Länge des Konstrukts stiegen (Abb. 13 B). Im Wachstum war kein Unterschied zwischen den Transformanten zu sehen (Abb. 13 A), die Höhe der Aktivitäten sank aber über die Zeit leicht ab (Abb. 13 B).

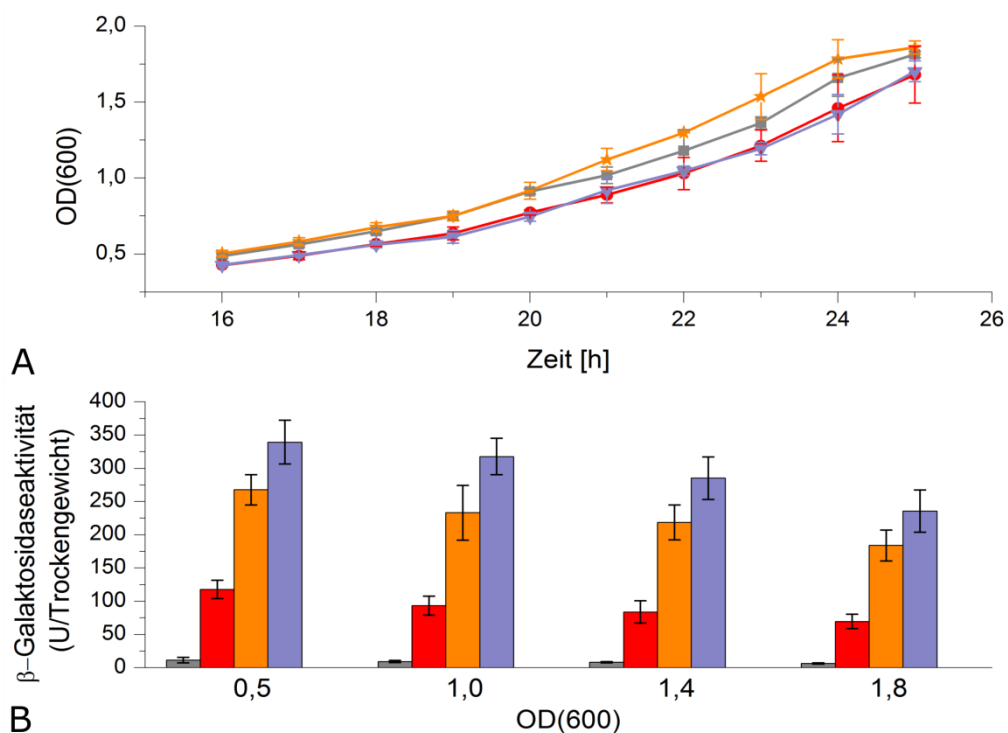


Abb. 13: β -Galaktosidase-Aktivitäten der translationalen Fusionen von $atpI_{Cmet}'$ mit $lacZ$ über die Zeit.

(A) Während des Wachstums von *C. metallidurans* AE104 mit pECD1556 oder pECD1578-pECD1581 in TMM_{NaGluc} bei 30 °C wurden die Kulturen mit 200 rpm geschüttelt. Die Plasmide kodierten für $lacZ$ ohne Promotor (grau), $atpI3_{Cmet}'-lacZ$ (rot), $atpI84_{Cmet}'-lacZ$ (braun) und $atpI162_{Cmet}'-lacZ$ (lila) unter Kontrolle des $atpIp_{Cmet}$. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivitäten entnommen. (B) Die ermittelten Werte wurden der OD₆₀₀ zugeordnet, die die Kultur zum Zeitpunkt der Probenentnahme aufwies. Die Abweichungen von mindestens drei Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

3.2.2 $atpI_{Cmet}$ als Teil des atp_{Cmet} -Operons

Neben der Länge von $atpI_{Cmet}$ gegenüber von $atpI_{Eco}$ weist das atp_{Cmet} -Operon eine weitere Besonderheit auf. Während die RBS von $atpB_{Eco}$ bei einem intergenischen Bereich von 8 bp

3 Ergebnisse

mit dem Ende von *atpI_{Eco}* überlappt, ist das Stoppcodon von *atpI_{Cmet}* 234 bp vom Startcodon von *atpB_{Cmet}* entfernt (Abb. 14). Da der Abstand so groß ist, stellte sich die Frage, ob *atpI_{Cmet}* Teil des *atp_{Cmet}*-Operons ist.

```

GCTCGCGATTTCGCTAGgcggtgcgggcactggatgcagatgaggcagccccagggaaat
    atpICmet                                     -35
caagaggtttcaaacgcgatgcgtcacaacggtgccgtgtcgcgtgactaaggtttgcca
agaataacaaggcgtacttgctccaagcggtgaccggtcatgtgaccgaaggctaagcaa
-10                                     -35
gacgtgtaccgggaatcggccgaaggcggtttccgatgtcagatttcgcaatatacggg
    -10                                     -35                                     -10
tcgttttcgacATGTCAGCTGAAGCTA
    atpBCmet

```

Abb. 14: Der intergenische Bereich zwischen *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}*.

Mögliche -10- und -35-Regionen, die der RBS von σ^H aus *B. subtilis* ähneln, sind unterstrichen. Die für *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}* kodierenden Bereiche sind in Großbuchstaben geschrieben.

Die Zugehörigkeit von *atpI_{Cmet}* zum *atp_{Cmet}*-Operon wurde über die semi-quantitative RT-PCR untersucht. Da ein Operon in eine einzelne mRNA transkribiert wird (Jacob und Monod, 1961), kann über die RT-PCR gezeigt werden, ob *atpI_{Cmet}* auf der gleichen mRNA liegt wie *atpB_{Cmet}*. Dafür wurden *C. metallidurans* AE104 und CH34 in TMM_{NaGluc} angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,6±0,1 für die Isolierung der Gesamt-RNA geerntet. Die Methoden zur Isolierung und Reinigung der RNA, der cDNA-Synthese und RT-PCR sind in Abschnitt 2.2.1-2.2.4 beschrieben. Für die RT-PCR wurden die Primer so gewählt, dass sie jeweils in zwei verschiedenen Genen anlagerten. Als Kontrolle für das Funktionieren der PCR wurde chromosomale DNA von *C. metallidurans* AE104 als *Template* eingesetzt. Ob die für die cDNA-Synthese verwendete RNA frei von DNA war, wurde jeweils über eine PCR mit der verwendeten RNA als *Template* und den gleichen Primern getestet. Die genutzten Primerpaare sind unter Abb. 15 aufgelistet.

3 Ergebnisse

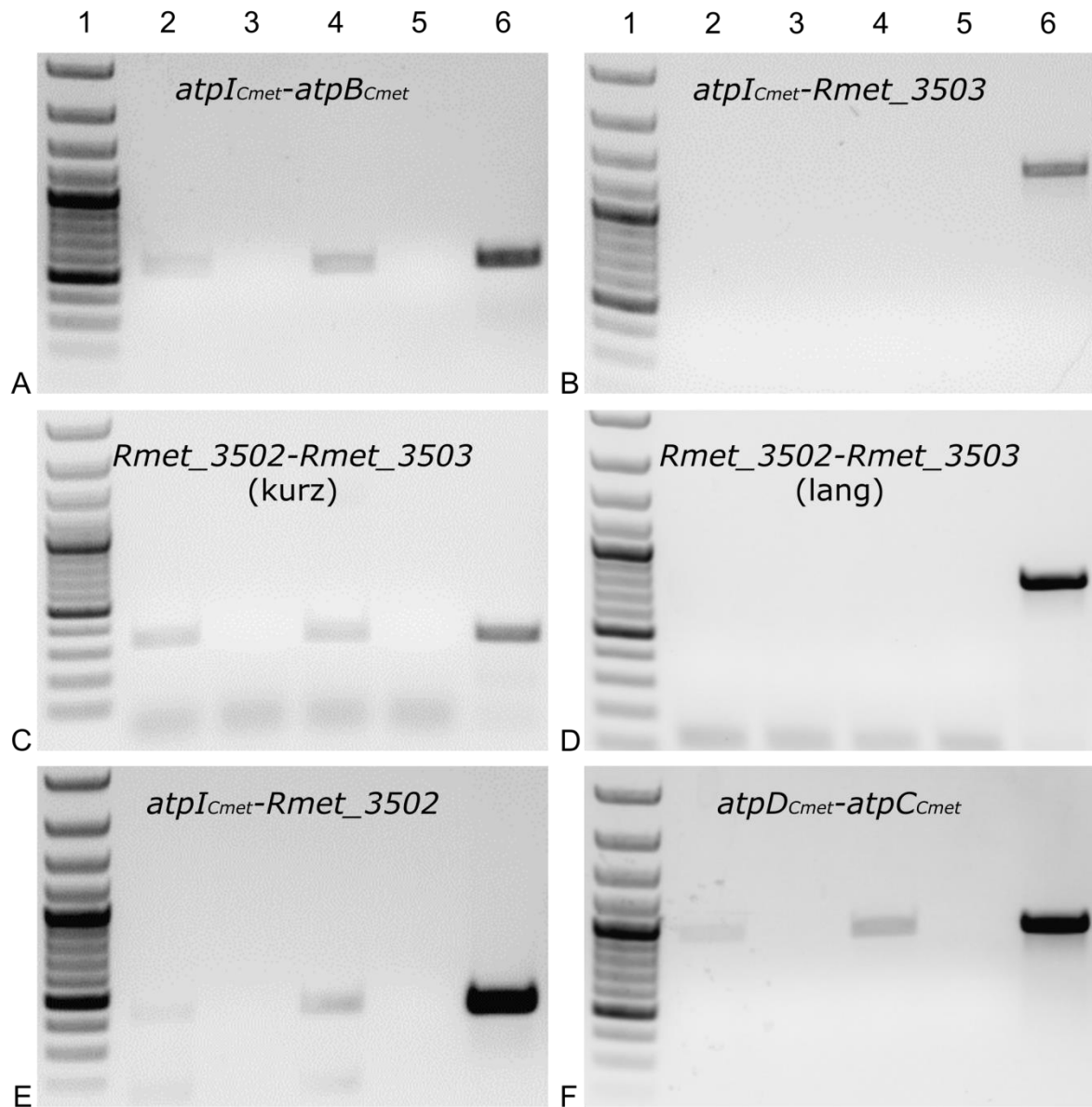


Abb. 15: Ermittlung der Zugehörigkeit von *atpI_{Cmet}* zum *atp_{Cmet}*-Operon mittels RT-PCR.

Gelelektrophorese der RT-PCR über 1 %iges Agarosegel. Die PCR wurde mit Primern durchgeführt, die innerhalb von (A) *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}* (AH3 und AH4), (B) *atpI_{Cmet}* und *Rmet 3503* (AH11 und AH56), (C) *Rmet 3502* und *Rmet 3503* (kurz, AH11 und AH36), (D) *Rmet 3502* und *Rmet 3503* (lang, AH36 und AH39), (E) *atpI_{Cmet}* und *Rmet 3502* (AH1 und AH56) sowie (F) *atpD_{Cmet}* und *atpC_{Cmet}* (AH58 und AH61) binden. Als *Template* dienten jeweils cDNA (2) und RNA (3) von *C. metallidurans* CH34 sowie cDNA (4), RNA (5) und DNA (6) von *C. metallidurans* AE104. Als Größenstandard wurde der *Gene Ruler™ 100 pb Plus DNA Ladder* verwendet.

Zur Positivkontrolle wurden die Primer AH61 und AH58 verwendet, die in *atpD_{Cmet}* und *atpC_{Cmet}* binden, den letzten Genen im *atp_{Cmet}*-Operon. Wie erwartet erschien eine Bande bei Verwendung von cDNA und DNA als *Template*, nicht mit der RNA. Die für die cDNA-

3 Ergebnisse

Synthese verwendete RNA war demnach frei von DNA (Abb. 15 F). Letzteres konnte bei Verwendung aller Primerkombinationen bestätigt werden (Abb. 15).

Eine PCR mit den Primern AH3 und AH4 sollte zeigen, ob *atpI_{Cmet}* Teil des *atp_{Cmet}*-Operons ist. Sie sind zu *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}* komplementär. Wie schon für die Positivkontrolle erhielt man ein Signal für die cDNA von *C. metallidurans* AE104 und CH34, was zeigt, dass *atpI_{Cmet}* Teil des *atp_{Cmet}*-Operons ist (Abb. 15 A).

Als Negativkontrolle für die Methode der RT-PCR wurden die Primer AH1 und AH56 verwendet, die in *atpI_{Cmet}* und *Rmet 3502* binden. *Rmet 3502* befindet sich stromaufwärts von *atpI_{Cmet}*, ist entgegengesetzt zu diesem orientiert und kodiert für ein hypothetisches Protein (VIMSS1775892). Entgegen der Erwartung war auch bei Verwendung von cDNA als *Template* ein PCR-Produkt zu erkennen (Abb. 15 E). Verwendete man Primer, die in *atpI_{Cmet}* und *Rmet 3503* (VIMSS1775893), dem zweiten Gen stromaufwärts von *atpI_{Cmet}*, oder *Rmet 3502* und *Rmet 3503* binden, erhielt man jedoch keine Signale (Abb. 15 B und D). Verkürzte man den amplifizierten Bereich zwischen *Rmet 3502* und *Rmet 3503* durch die Verwendung der Primer AH36 und AH11 war wieder ein Signal zu sehen (Abb. 15 C). Die Daten zeigten damit kein eindeutiges Ergebnis. Zur besseren Anschaulichkeit sind die Ergebnisse der RT-PCR in Abb. 16 zusammengefasst.

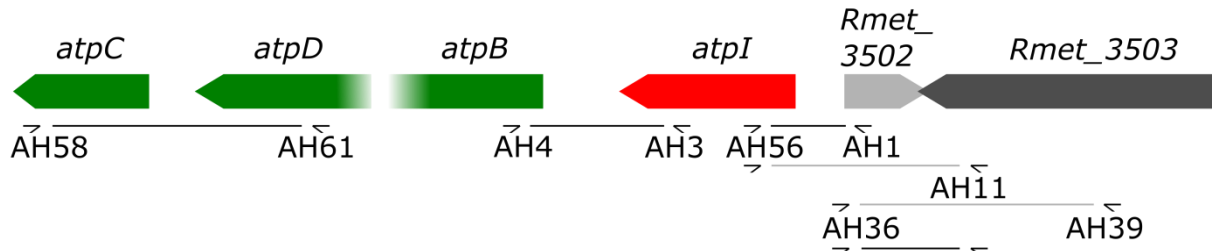


Abb. 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der RT-PCR

Die Lage und Orientierung der in der RT-PCR verwendeten Primer ist hier schematisch durch Pfeile dargestellt. Die zwischen den Pfeilen liegenden Striche deuten an, ob die entsprechende Primerkombination in der RT-PCR mit cDNA als *Template* zu einem positiven (schwarz) oder keinem Signal (grau) führte. Die zum *atp_{Cmet}*-Operon gehörigen Gene sind in Grün dargestellt, *atpI_{Cmet}* in Rot und alle stromaufwärts von *atpI_{Cmet}* liegenden Gene in Grautönen.

3.2.3 Existiert ein Promotor in dem intergenischen Bereich zwischen *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}*?

Bei einem Vergleich der intergenischen Region zwischen *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}* mit Promotorbindestellen in *B. subtilis* wurden an mehreren Stellen Gemeinsamkeiten mit der -10 und -35 Region von σ^H gefunden (Abb. 14). Die -10 Region setzt sich aus (A/C) G A A T zusammen, die -35 Region ist mit der Sequenz (A/G) (A/G/C) A G G A (A/T) (A/T) T variabler. Der Sigma-Faktor H reguliert in *B. subtilis* die Genexpression in der

3 Ergebnisse

postexponentiellen Wachstumsphase, die ersten Schritte der Sporulation und die Entwicklung der natürlichen Kompetenz (Haldenwang, 1995).

Da man in *E. coli* und *C. glutamicum* mindestens einen zusätzlichen Promotor vor *atpB* fand (Barriuso-Iglesias *et al.*, 2006; Von Meyenburg *et al.*, 1982), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob in *C. metallidurans* ebenfalls ein Promotor direkt vor *atpB* existiert. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Reporterfusionen in pECD1556 hergestellt. Neben pECD1578, das für *atpI3_{Cmet}'-lacZ* unter Kontrolle des *atpIp_{Cmet}* kodiert, wurden die Plasmide pECD1581-pECD1584 hergestellt. Sie kodieren für *atpB3_{Cmet}'-lacZ* (pECD1582) und *atpE3_{Cmet}'-lacZ* (pECD1584) unter Kontrolle des *atpIp_{Cmet}* beziehungsweise für *atpB3_{Cmet}'-lacZ* (pECD1581) und *atpE3_{Cmet}'-lacZ* (pECD1583) unter Kontrolle des möglichen *atpBp_{Cmet}*. Die Zahl 3 bezieht sich jeweils auf die Anzahl der mit *'lacZ* fusionierten Basenpaare des entsprechenden Gens. Die Plasmide wurden über Konjugation in *C. metallidurans* AE104 gebracht und die Stämme wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben in TMM_{NaGluc} pH 7,0 angezogen.

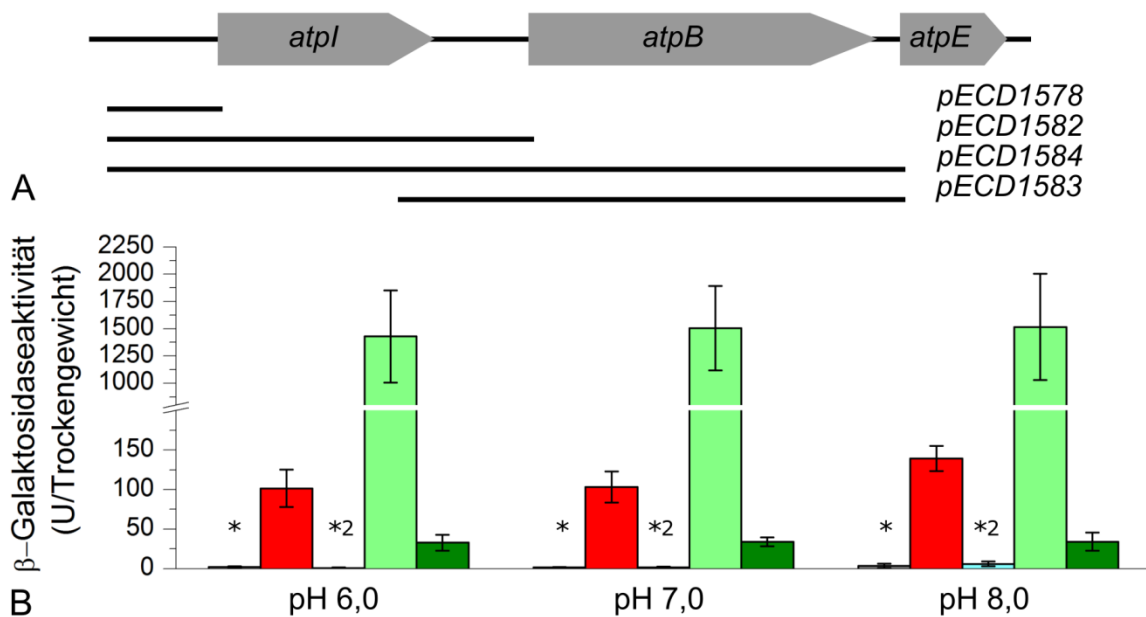


Abb. 17: Die Promotoren des *atp_{Cmet}*-Operons.

A Schematische Darstellung der für die translationalen Fusionen mit *lacZ* verwendeten Regionen aus *C. metallidurans*. Die Striche unter den ersten Genen des *atp_{Cmet}*-Operons geben die Regionen an, die für die Fusion mit *lacZ* verwendet wurden. B Die β -Galaktosidase-Aktivitäten von *lacZ* unter Kontrolle eines Promotors (*grau) und der translationalen Reporterfusionen von *atpI3_{Cmet}'-lacZ* (rot), *atpB3_{Cmet}'-lacZ* (*²hellblau) und *atpE3_{Cmet}'-lacZ* (hellgrün) unter Kontrolle des *atpIp_{Cmet}* sowie *atpE3_{Cmet}'-lacZ* (grün) unter Kontrolle des intergenischen Bereichs zwischen *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}*. Die Stämme *C. metallidurans* AE104 mit den Plasmiden pECD1556, pECD1578 oder pECD1582-pECD1584 wurden in TMM_{NaGluc} pH 6,0; pH 7,0 oder pH 8,0 angezogen und bei OD₆₀₀ 0,6±0,1 für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivitäten geerntet. Die Abweichungen von mindestens fünf Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

3 Ergebnisse

Wie schon zuvor beobachtet, zeigte $AtpI3_{Cmet}'\text{-LacZ}$ deutliche Aktivität (vergl. Abb. 13 und Abb. 17). Für $AtpB3_{Cmet}'\text{-LacZ}$ konnten keine Werte deutlich über denen der Negativkontrolle gemessen werden, egal ob das Gen unter Kontrolle des intergenischen Bereichs zwischen $atpI_{Cmet}$ und $atpB_{Cmet}$ oder $atpIp_{Cmet}$ stand (Abb. 17; Abb. A 1).

Ähnlich wie in *E. coli* war die Aktivität für $AtpE3_{Cmet}'\text{-LacZ}$ unter Kontrolle des $atpIp_{Cmet}$ sehr hoch und überstieg die Aktivität für $AtpI3_{Cmet}'\text{-LacZ}$ um ein Vielfaches (vergl. Abb. 9). Die Enzymaktivität für $AtpE3_{Cmet}'\text{-LacZ}$ unter Kontrolle des intergenischen Bereichs zwischen $atpI_{Cmet}$ und $atpB_{Cmet}$ war geringer als die für $AtpI3_{Cmet}'\text{-LacZ}$, aber 18-fach höher als die Negativkontrolle (Abb. 17).

Die Änderung des pH-Wertes im Anzuchtmedium auf pH 6,0 oder 8,0 hatte kaum einen Einfluss auf die Höhe der β -Galaktosidase-Aktivitäten. Nur die Aktivität für $AtpI3_{Cmet}'\text{-LacZ}$ stieg leicht an, wenn die Transformante in TMM_{NaGluc} pH 8,0 angezogen wurde (Abb. 17).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Startcodon von $atpI_{Cmet}$ korrekt annotiert ist und $AtpI_{Cmet}$ in geringeren Mengen synthetisiert wird als $AtpE_{Cmet}$. Neben dem Promotor vor dem atp_{Cmet} -Operon weisen die Ergebnisse auf die Existenz mindestens eines schwachen Promotors vor $atpE_{Cmet}$ hin, der wie dieser nicht durch den pH-Wert des Anzuchtmediums beeinflusst wird.

3.3 *AtpI* von *E. coli* – Topologie und Interaktion mit anderen Proteinen

Trotz der umfassenden Aufklärung der Struktur der F_1F_0 -ATPase in *E. coli* und anderen Organismen ist nur wenig über $AtpI$ bekannt. $AtpI_{Eco}$ lässt sich zusammen mit dem F_0 -Komplex aus der Membran reinigen und über einen Western Blot nachweisen (Schnepppe *et al.*, 1991). Es scheint demnach zumindest mit einem Protein des F_0 -Komplexes temporär zu interagieren. Dies wurde später durch die Ko-Reinigung von $AtpI$ -His und $AtpE$ der Na^+ translokalisierenden F_1F_0 -ATPase aus *Propionigenium modestum* unterstützt (Suzuki *et al.*, 2007). Bley (2014) wiederholte letzteres Experiment während seiner Diplomarbeit mit den Proteinen aus *E. coli* und konnte die Interaktion bestätigen. Es blieb jedoch die Frage offen, ob $AtpI_{Eco}$ mit weiteren Proteinen des Komplexes interagiert. Dieses Kapitel geht auf die Membran-Topologie von $AtpI_{Eco}$ ein und behandelt die Suche nach weiteren Interaktionspartnern von $AtpI_{Eco}$.

3.3.1 Die Topologie der Transmembrandomänen von AtpI_{Eco}

In Vorbereitung auf die Durchführung und Interpretation von Experimenten zur Suche nach Protein-Protein-Interaktionen wurde zunächst die Struktur von AtpI_{Eco} untersucht. Vor allem die Lage des N- und C-Terminus sollte geklärt werden. Nach der Vorhersage des TMHMM Servers sind N- und C-Terminus mit hoher Wahrscheinlichkeit im Zytoplasma lokalisiert, wobei diese Vorhersage jedoch kein eindeutiges Ergebnis zeigt (Abb. 10). Die Programme HmmTop 2.0 und MEMSAT-SVM sagen ebenfalls eine Lokalisierung im Zytoplasma voraus. Nur die Zuordnung der einzelnen Aminosäuren zu den Transmembrandomänen variiert leicht zwischen den Programmen (Tab. 7).

Tab. 7: Vorhersage der Topologie von AtpI_{Eco} (VIMSS 17799)

Programm	Anzahl der Transmembrandomänen	Lokalisation des N-Terminus	Zuordnung der Aminosäuren zu den TMHs
TMHMM 2.0 ^{1,2}	4	Zytoplasma	10-29; 36-58; 73-95; 100-122
HmmTop 2.0 ^{3,4}	4	Zytoplasma	14-31; 36-58; 83-100; 105-122
SOSUI/G 1.1 ^{5,6,7}	4	Keine Angabe	14-36; 38-60; 76-98; 102-124
MEMSAT-SVM ^{8,9,10}	4	Zytoplasma	15-31; 35-58; 75-98; 102-120

¹ (Krogh *et al.*, 2001); ² (Sonnhammer, Von Heijne and Krogh, 1998); ³ (Tusnády and Simon, 1998); ⁴ (Tusnády and Simon, 2001); ⁵ (Hirokawa, Boon-Chieng and Mitaku, 1998); ⁶ (Mitaku and Hirokawa, 1999); ⁷ (Mitaku, Hirokawa and Tsuji, 2002); ⁸ (Jones, Taylor and Thornton, 1994); ⁹ (Jones, 2007); ¹⁰ (Nugent and Jones, 2009)

Um die Anzahl der Transmembrandomänen und die Lokalisierung des N-Terminus experimentell zu bestätigen, wurden die Eigenschaften von LacZ und PhoA genutzt. Während LacZ im Zytoplasma aktiv ist (Froshauer *et al.*, 1988), nimmt PhoA nur im Periplasma eine aktive Konformation ein (Manoil und Beckwith, 1986). Die Methode wurde oft angewendet, um die Topologie von Membranproteinen experimentell zu bestimmen (Boyd *et al.*, 1987; Akiyama and Ito, 1989; Goldberg *et al.*, 1999). Mit fehlender oder mutierter Signalsequenz (Michaelis *et al.*, 1983) wird der Reporter PhoA mit Hilfe der N-terminal fusionierten Signalsequenz des zu untersuchenden Proteins ins Periplasma transportiert und faltet dort zum aktiven Enzym (Manoil und Beckwith, 1985; Manoil und Beckwith, 1986). Ist das Protein im

3 Ergebnisse

Zytoplasma lokalisiert, können sich die für die aktive Konformation von PhoA charakteristischen Disulfidbrücken nicht bilden und das Enzym bleibt inaktiv (Derman und Beckwith, 1991; Hoffman und Wright, 1985). In der Literatur hatte ein Vergleich von experimentellen Daten mit den dazugehörigen Topologievorhersagen gezeigt, dass sie gut miteinander übereinstimmen. Je mehr Programme das gleiche vorhersagen, desto höher ist die Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen (Drew *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurden nur vier am C-Terminus verkürzte Varianten von *AtpI_{Eco}* mit 'LacZ bzw. 'PhoA fusioniert.

Für die Herstellung von Reporterfusionen mit 'lacZ und einer N-terminal verkürzten Variante von *phoA*, in der die Signalsequenz für den Transport ins Periplasma fehlt, wurden die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. H. Nies hergestellten Plasmide pECD636 und pECD637 verwendet (Pribyl, 2001). Ausgehend von der Vorhersage des TMHMM Servers 2.0 wurden C-terminal verkürzte Versionen von *atpI_{Eco}* beginnend mit der eigenen RBS mit 'lacZ und 'phoA fusioniert. Die Länge der Fragmente wurde so gewählt, dass das 5'-Ende von *atpI_{Eco}* jeweils bis zum Ende einer der vorhergesagten Schleifen reichte, um Probleme bei der Faltung des Fusionsproteins oder der Funktion des Reporterproteins zu vermeiden. Der erste Bereich des Fusionsproteins reichte demnach vom Startcodon bis Aminosäure 35, 72, 99 oder 126 von *AtpI_{Eco}*. Zur Kontrolle wurde *blaM* mit 'lacZ beziehungsweise 'phoA fusioniert. *blaM* kodiert für die β -Laktamase und besitzt ein Signalpeptid für den Transport ins Periplasma (Kadonaga *et al.*, 1984; Koshland und Botstein, 1982). In dem Konstrukt *blaM*'-Reporter gen ist das Signalpeptid vorhanden, in dem Konstrukt 'blaM'-Reporter gen nicht.

3 Ergebnisse

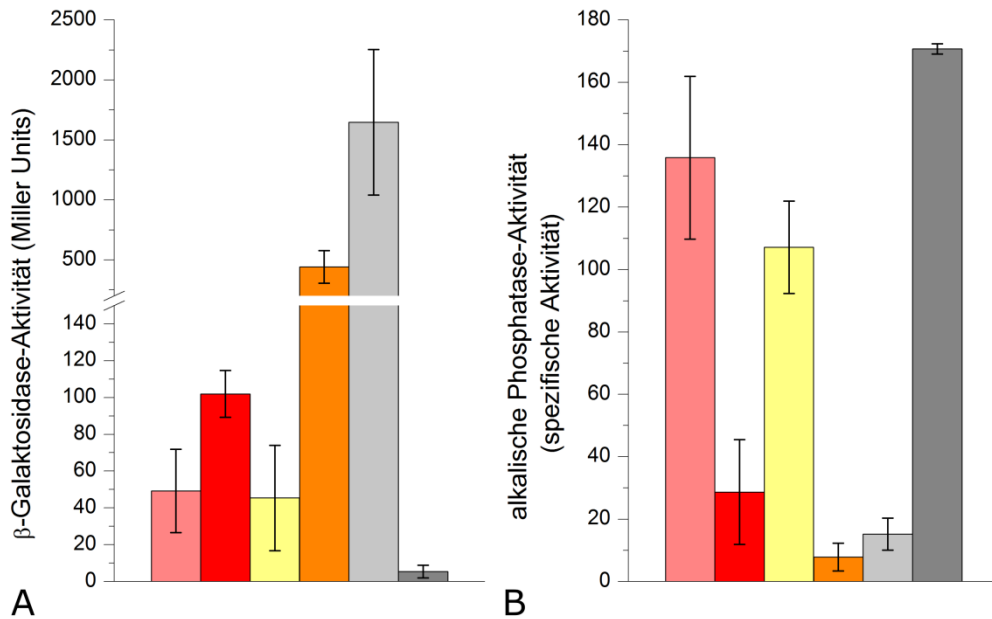


Abb. 18: Die Lokalisierung des N- und C-Terminus von AtpI_{Eco}.

Verkürzte Varianten von AtpI_{Eco}, AtpI₃₅_{Eco}' (hellrot), AtpI₇₂_{Eco}' (rot), AtpI₉₉_{Eco}' (gelb) und AtpI₁₂₆_{Eco}' (orange) wurden mit 'LacZ (A) und 'PhoA (B) fusioniert und die entsprechenden Aktivitäten gemessen. Als Kontrolle dienten 'BlaM'- (hellgrau) und BlaM'-LacZ/PhoA (grau). Die Messungen wurden von Bahr (2014) im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Die Abweichungen von mindestens drei Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

Die Experimente zur Ermittlung der Alkalischen-Phosphatase- oder β-Galaktosidase-Aktivität erfolgten im *E. coli* Stamm CC118, in dem sowohl *lacZ* als auch *phoA* deletiert sind. Die genauen Anzuchtbedingungen sind in Abschnitt 2.6.5 beschrieben. Die Alkalische-Phosphatase-Aktivitäten für AtpI₃₅_{Eco}'-PhoA und AtpI₉₉_{Eco}'-PhoA lagen deutlich über der der Negativkontrolle 'BlaM'-PhoA, während die für AtpI₇₂_{Eco}'-PhoA und AtpI₁₂₆_{Eco}'-PhoA darunter bis wenig darüber lagen. Die β-Galaktosidase-Aktivitäten verhielten sich demgegenüber komplementär (Abb. 18 A und B). Dies bestätigt, dass N- und C-Terminus von AtpI_{Eco} wie vorhergesagt im Zytoplasma lokalisiert sind und das Protein vier Transmembrandomänen besitzt.

3.3.2 Lokalisierung von AtpI_{Eco} in der Membran mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um die Lokalisierung von AtpI_{Eco} innerhalb der Zelle zu visualisieren, wurde *atpI_{Eco}* mit *egfp* fusioniert und in die *attTn7 site* stromabwärts von *glmS* in *E. coli* BW25113 integriert. In dem resultierenden Stamm ECB175 stand das Fusionsgen unter Kontrolle des *atpI_{Eco}*. Damit ein natürliches Expressionslevel gewährleistet ist, wurde das 5'-Ende von *egfp* mit den ersten 15 Basen von *atpI_{Eco}* fusioniert. Da laut verschiedenen Vorhersageprogrammen nur wenige AS des N-Terminus von AtpI_{Eco} im Zytoplasma lokalisiert sind (Tab. 7), wurde *egfp* am 3'-Ende mit *atpI_{Eco}* beginnend mit der vierten Base der kodierenden Sequenz fusioniert. Dies sollte

3 Ergebnisse

verhindern, dass Probleme bei der Faltung des Proteins auftreten. Um die Lokalisierung von $AtpI_{Eco}$ und eGFP voneinander zu unterscheiden, wurde *egfp* unter Kontrolle des *atpIp_{Eco}* ohne die Fusion mit *atpIp_{Eco}* am 3'-Ende in *E. coli* BW25113 integriert, woraus ECB174 entstand. In Abschnitt 2.6 ist die Entstehung der Stämme beschrieben.

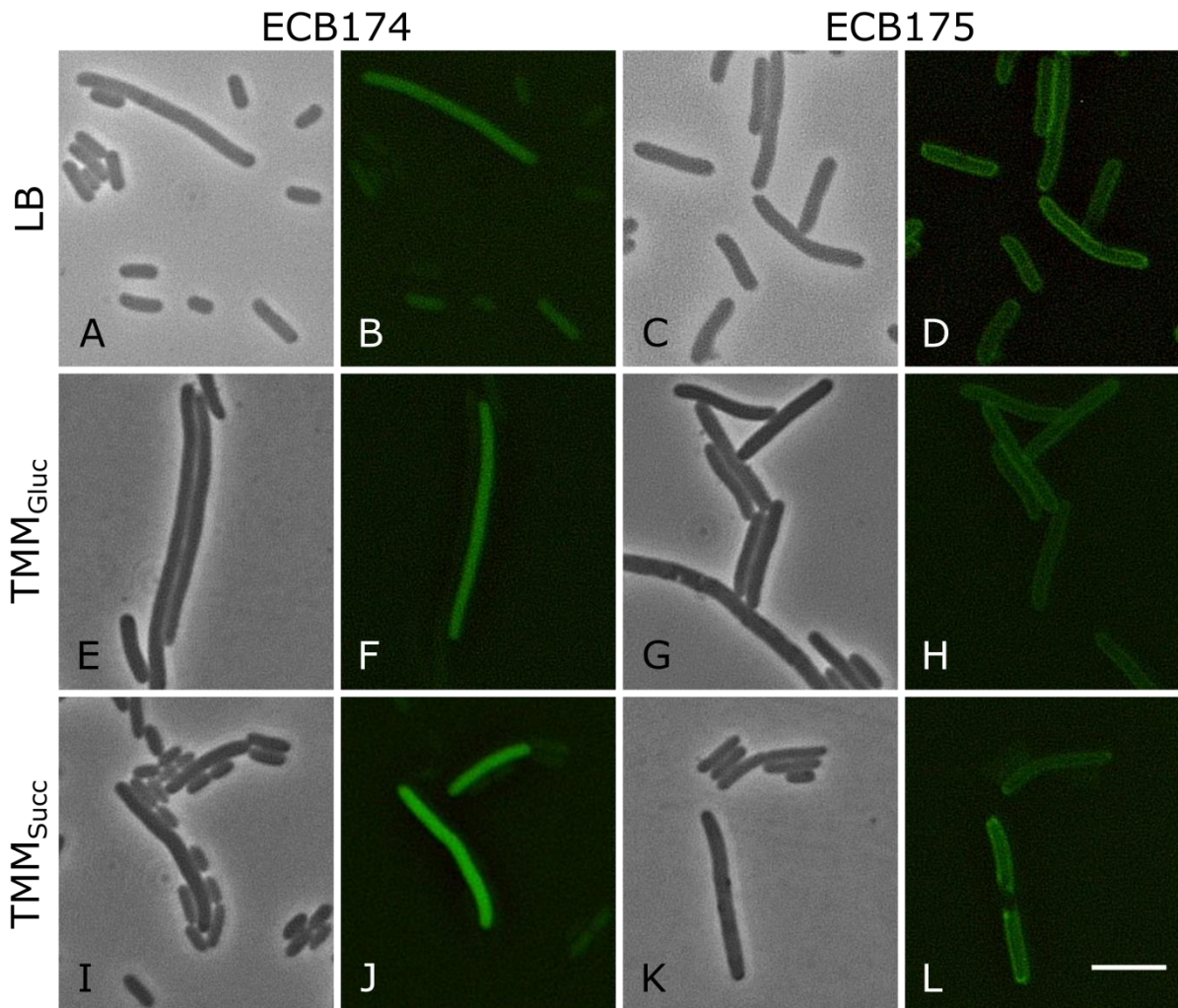


Abb. 19: Mikroskopische Aufnahmen von ECB174 und ECB175.

Die Stämme wuchsen bei 37 °C schüttelnd in LB-Medium (A-D), TMM_{Gluc} (E-H) oder TMM_{Succ} (I-L). 26 h nach Animpfen der Hauptkultur wurden die Zellen auf einen mit 1 % Agarose überzogenen Objektträger getropft und mit dem Ölimmersionsobjektiv (100x/ 1,30) bei Phasenkontrast 3 des Axioskop (Zeiss) lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht (A, C, E, G, I, K). Die Fluoreszenzbilder (B, D, F, H, J, L) entstanden mit zugeschalteter Fluoreszenzlampe mit dem Filter I. Über das Fluoreszenzbild wurde mit dem Programm Fiji (Schindelin *et al.*, 2012, 2015) der Filter *Unsharp Mask* (Radius=20) gelegt, damit die Objekte besser sichtbar sind. Die linken zwei Reihen von oben nach unten zeigen ECB174 (*glmS::atpIp-atpI'-strep-egfp*), die rechten 2 Reihen ECB175 (*glmS::atpIp-atpI'-strep-egfp'-atpI*). Der weiße Balken rechts unten im Bild entspricht 5 μ m Länge.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen belegen, dass $AtpI$ '-eGFP beziehungsweise $AtpI$ '-eGFP'- $AtpI$ in ECB174 und ECB175 synthetisiert wurden und das Fluorophor aktiv

3 Ergebnisse

war. Wie erwartet war AtpI'-eGFP im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 19 B, F, J), während AtpI'-eGFP-'AtpI in die Membran integriert wurde (Abb. 19 D, H, L). Ein Vergleich der licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigte, dass die Proteine nicht in allen Zellen gleich stark oder überhaupt sichtbar waren. Unabhängig vom verwendeten Medium fluoreszierte von ECB174 die gesamte Zelle, von ECB175 die Membran mit einigen Akkumulationen (Abb. 19).

Eine Ko-Lokalisation mit der F_1F_0 -ATPase sollte zeigen, ob das Enzym ebenfalls über die komplette Membran verteilt ist und an den gleichen Stellen akkumuliert. Ein Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten sollte darüber hinaus Aufschluss geben, ob das Enzym ebenso wie AtpI'-eGFP-'AtpI in einigen Zellen weniger stark synthetisiert wird als in anderen. Dafür wurde stellvertretend die Untereinheit AtpB_{Eco} am C-Terminus mit mCherry fusioniert.

E. coli BW25113 mit pECD1591 wurde in LB-Medium angezogen und mikroskopiert, um zu testen, ob AtpB'-mCherry synthetisiert wird. Die Zellen zeigten ein gleichmäßig über die Zelle verteiltes Fluoreszenzsignal, dass im Zytoplasma lokalisiert war (Abb. A 2). Gleichzeitig konnte ausgeschlossen werden, dass Signale von mCherry mit dem gleichen Filter zu sehen sind, der für die Aufnahmen mit eGFP-Fusionsproteinen verwendet wird. Andersherum wurde dies auch mit ECB175 geprüft.

Da *atpB_{Eco}* im *atp_{Eco}*-Operon direkt auf *atpI_{Eco}* folgt, wurde *atpB'*-mcherry zusammen mit *atpI'*-egfp-'*atpI* unter Kontrolle des *atpI_{pEco}* in das Chromosom von *E. coli* BW25113 integriert. Der Stamm ist unter der Bezeichnung ECB176 in Tab. 1 aufgelistet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte man nur Signale von AtpI'-eGFP-'AtpI, nicht von AtpB'-mCherry erkennen (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Beziehung von AtpI_{Eco} zur F_1F_0 -ATPase mit anderen Methoden untersucht.

3.3.3 Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen mit dem BACTH-Assay

Eine Methode um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen ist der *Bacterial Two Hybrid* (BACTH)-Assay, der das erste Mal von Karimova *et al.* (1998) beschrieben und später weiterentwickelt wurde (Karimova *et al.*, 1998; Karimova *et al.*, 2001; Karimova *et al.*, 2005). Er beruht auf der Aktivität des nicht toxischen T18- und T25-Fragments der Adenylatcyclase (CyaA) von *Bordetella pertussis*. Im Folgenden werden die CyaA-Fragmente als T18- bzw. T25-Fragment bezeichnet.

Wenn sich die T18- und T25-Fragmente in räumlicher Nähe befinden, wird cAMP synthetisiert. cAMP wiederum bildet einen Komplex mit dem *Catabolite Activator Protein*,

3 Ergebnisse

welcher mit der entsprechenden Bindestelle des *lac*-Operons interagiert. Damit wird die Affinität der RNA-Polymerase zum Promotor erhöht, wodurch die Expression der Gene des *lac*-Operons aktiviert wird. Zu diesen Genen gehört unter anderem *lacZ*, welches für die β -Galaktosidase kodiert und dessen enzymatische Aktivität durch verschiedene Methoden sichtbar gemacht werden kann. Der BACTH-Assay nutzt dieses Prinzip, indem das T18- und T25-Fragment mit Zielproteinen fusioniert werden. Interagieren die Proteine miteinander oder befinden sie sich in räumlicher Nähe, bilden das T18- und T25-Fragment eine katalytisch aktive Domäne.

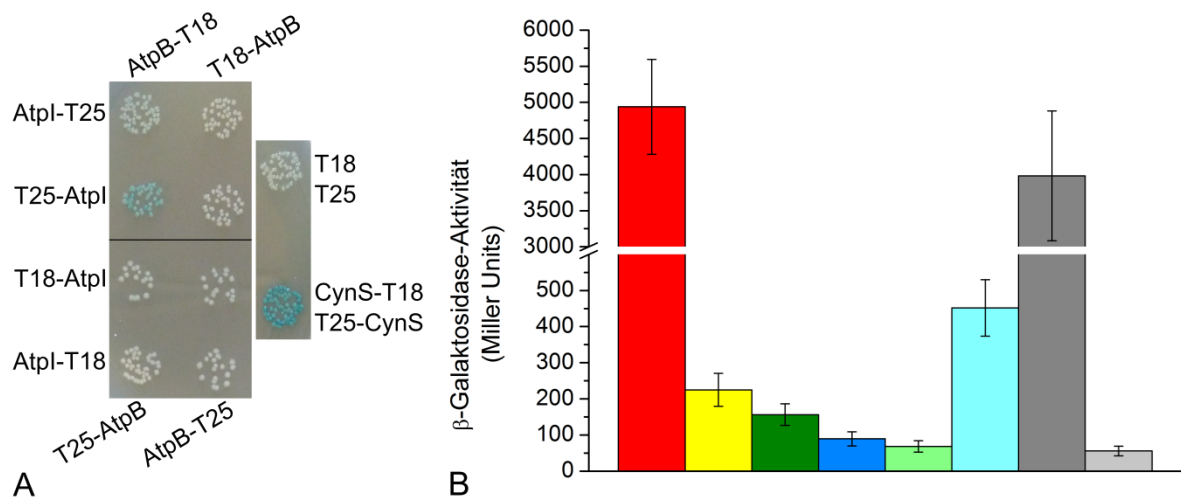
Um auszuschließen, dass das T18- und T25-Fragment selbst miteinander interagieren, wurde *E. coli* BTH101 als Negativkontrolle mit den Plasmiden pUT18 und pKT25 transformiert. Als Positivkontrolle wurden die Plasmide pECD1296 und pECD1298 verwendet, die für *cynS_{Eco}'-cyaAT18* und *cyaAT25'-cynS_{Eco}* kodieren. *CynS_{Eco}* ist ein lösliches Protein und wurde ausgewählt weil es nativ als ein aus 5 Dimeren zusammengesetztes Homodecamer vorliegt (Anderson, 1980; Walsh *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu *CynS_{Eco}* handelt es sich bei *AtpI_{Eco}* um ein Membranprotein. Dass der BACTH-Assay auch mit Membranproteinen durchgeführt werden kann, wurde mit Proteinen aus *E. coli* (Karimova *et al.*, 2005; Karimova *et al.*, 2009) und anderen Organismen (Maxson und Darwin, 2006; Hara *et al.*, 2008; Georgiadou *et al.*, 2012) gezeigt.

Da die Methode auf der Interaktion des T18- und T25-Fragments im Zytoplasma beruht, ist die Lokalisierung des mit dem Zielprotein fusionierten T18- bzw. T25-Fragments für die Auswertung der Experimente entscheidend. Die Lokalisierung des N- und C-Terminus von *AtpI_{Eco}* wurde in Abschnitt 3.3.1 dargelegt. Die Topologie der übrigen Proteine des F_o -Teils wurde in der Vergangenheit charakterisiert. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tab. 8 aufgelistet. Da der N-Terminus von *AtpB_{Eco}* und *AtpF_{Eco}* im Periplasma lokalisiert ist, können nach Einbau in die Membran nur die Fusionen an den C-Terminus positive Signale zeigen. Die Termini von *AtpE_{Eco}* sind beide im Periplasma lokalisiert und dementsprechend ist eine Interaktion mit *AtpI_{Eco}* nach dem Einbau in die Membran mittels des BACTH Systems nicht nachweisbar.

Tab. 8: Topologie der Proteine des F_o-Komplexes

Protein	Lokalisierung des N-Terminus	Anzahl der TMHs	Quelle
AtpI _{Eco}	Zytoplasma	4	Bahr, 2014
AtpB _{Eco}	Periplasma	5	Schneider und Altendorf 1987
AtpE _{Eco}	Periplasma	2	Schneider und Altendorf 1987
AtpF _{Eco}	Periplasma	1	Schneider und Altendorf 1987

Der BACTH-Assay wurde mit allen Proteinen des F_o-Komplexes in allen möglichen Plasmidkombinationen durchgeführt, unabhängig von der Lokalisation des N- und C-Terminus. Die initialen Versuche für die Interaktionen von AtpI_{Eco} mit sich selbst und weiteren Untereinheiten der F₁F_o-ATPase wurden von Bahr (2014), Bley (2014) und Passian (2014) durchgeführt und dienten der ersten optischen Identifizierung möglicher Interaktionspartner von AtpI_{Eco}. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wiederholt und zusätzlich β -Galaktosidase-Assays durchgeführt, um die Interaktionen zu bestätigen und zu quantifizieren.

**Abb. 20: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit dem BACTH-Assay.**

(A) Transformanten mit verschiedenen Kombinationen aus BACTH-Plasmiden wurden zunächst auf X-Gal-haltige LB-Agarplatten getropft, wie hier für die Kombinationen von AtpI_{Eco} und AtpB_{Eco} zu sehen ist. Als Kontrolle dienten die Kombinationen CynS'-T18 und T25'-CynS sowie T18 und T25. Die in den Transformanten synthetisierten Fusionsproteine sind am Rand angegeben. (B) Von den Transformanten mit der optisch stärksten Blaufärbung wurde die β -Galaktosidase-Aktivität ermittelt. Von den Plasmid-Kombinationen wurden T25'-AtpI_{Eco} und AtpI_{Eco}'-T18 (rot), T25'-AtpI_{Eco} und AtpB_{Eco}'-T18 (gelb), T25'-AtpI_{Eco} und AtpE_{Eco}'-T18 (grün), AtpI_{Eco}'-T18 und T25'-AtpF_{Eco} (blau), AtpI_{Eco}'-T18 und T25'-AtpH_{Eco} (hellgrün), AtpI_{Eco}'-T18 und T25'-AtpC_{Eco} (hellblau), CynS'-T18 und T25'-CynS (grau, Positivkontrolle), T18 und T25 (hellgrau, Negativkontrolle) synthetisiert. Die Abweichungen von mindestens fünf unabhängigen Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

3 Ergebnisse

In Abb. 20 A sieht man exemplarisch das Ergebnis für die Interaktion von AtpI_{Eco} mit AtpB_{Eco} auf X-Gal-haltigen LB-Agarplatten. In den Blau gefärbten Zellen kam es zu einer Interaktion zwischen den Fusionsproteinen, welche die Synthese von cAMP durch die T18- und T25-Fragmente ermöglichte. Bei der Interaktion mit AtpB_{Eco} führte nur die Expression von T25-'AtpI und AtpB'-T18 zur Bildung des blauen Farbstoffs. Die Ergebnisse für alle übrigen Kombinationen sind in Tab. 9 zusammengefasst und im Detail im Anhang dargestellt (Abb. A 3).

Im Fall der Interaktion von AtpI_{Eco} mit sich selbst zeigten die Zellen mit allen möglichen Plasmidkombinationen bereits nach 24 h statt der üblichen 48 h eine deutliche Blaufärbung, was auf die Bildung von AtpI_{Eco}-Multimeren hindeutet. Bei der Interaktion zwischen AtpI_{Eco} und AtpF_{Eco} wurden Zellen die T25-'AtpF_{Eco} und AtpI_{Eco}'-T18 beziehungsweise T18-'AtpI_{Eco} synthetisierten ebenfalls blau. Da in diesem Fall das T25-Fragment nach Einbau von T25-'AtpF_{Eco} in die Membran im Periplasma lokalisiert ist, sollte eine Interaktion jedoch im nativen Zustand der Proteine nicht möglich sein. Auch die Kombination von T25-'AtpI_{Eco} und AtpE_{Eco}'-T18 resultierte in der Blaufärbung der *E. coli* BTH101-Zellen.

Tab. 9: Zusammenfassung der Ergebnisse des BACTH-Assays.

E. coli BTH101 wurde mit verschiedenen Kombinationen an BACTH-Plasmiden transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin, Kanamycin, IPTG und X-Gal ausplattiert. Die optischen Ergebnisse wurden nach 40stündiger Inkubation bei 30 °C dokumentiert. Von Transformanten mit der optisch stärksten Blaufärbung wurden β-Galaktosidase-Aktivitäten bestimmt.

	AtpI _{Eco}	AtpI _{Eco} ^X	AtpB _{Eco}	AtpE _{Eco}	AtpF _{Eco}	AtpH _{Eco}	AtpC _{Eco}
AtpI _{Eco}	+++		+/+	+/+	+/-	-/-	+/+
AtpI _{Eco} ^{S39G}	+++	+++	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-
AtpI _{Eco} ^{S39L}	++/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
AtpI _{Eco} ^{G43V}	++/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
AtpI _{Eco} ^{E79K}	+++	+++	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+
AtpI _{Eco} ^{K82E}	+++	+++	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-
AtpI _{Eco} ^{E79K K82E}	+++	+++	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+
AtpI _{Eco} ^{V88G}	+++	+++	+/+	+++	+++	-/-	+++

- keine/ + 1-2/ ++ mehr als 2 Kombinationen der in den Zellen synthetisierten Fusionsproteine resultieren in einer Blaufärbung.

- Aktivität geringer/ + Aktivität höher als das Doppelte der Negativkontrolle; ++ Aktivität höher als 500 Miller Units

^X Kombination von Fusionsproteinen der gleichen AtpI_{Eco} Mutante

3 Ergebnisse

Für die Quantifizierung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden Transformanten mit der nach 40 h Inkubation bei 30 °C auf Festmedium optisch stärksten Blaufärbung ausgewählt. Abb. 20 B zeigt die Ergebnisse des β -Galaktosidase-Assays für die Interaktionen von AtpI_{Eco} mit sich selbst und Untereinheiten des F_0 -Komplexes. Als Negativkontrolle diente die Aktivität der Kombination des T18- mit dem T25-Fragment welche wie schon in den Abbildungen zuvor zeigt, dass die Fragmente alleine nicht miteinander interagieren. Als Positivkontrolle wurde die Kombination von CynS-T18 und T25-CynS verwendet, für die eine hohe β -Galaktosidase-Aktivität ermittelt wurde.

Die Enzymaktivität für die Interaktion von AtpI_{Eco} -T18 mit T25-' AtpI_{Eco} lag mit 4938 *Miller Units* noch über der der Positivkontrolle, was dafür spricht, dass AtpI_{Eco} ein Multimer bildet. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten für die Kombinationen von T25-' AtpI_{Eco} und AtpB_{Eco} -T18 hingegen war etwa 20-fach niedriger, lag damit aber deutlich über der Negativkontrolle.

Die bei korrektem Einbau in die Membran im BACTH-Assay nicht nachzuweisende Interaktion von T25-' AtpI_{Eco} mit AtpE_{Eco} -T18 zeigte eine β -Galaktosidase-Aktivität von 156 *Miller Units* und ist damit etwa 3 Mal so hoch wie die Negativkontrolle. Eine Interaktion kann hier nur im Zytoplasma erfolgt sein, also noch vor dem Einbau von AtpE_{Eco} -T18 in die Membran. In seiner Diplomarbeit konnte Bley (2014) über einen Western Blot zeigen, dass der Einbau von T25-' AtpI_{Eco} und AtpE_{Eco} -T18 in die Membran nicht gestört ist.

Die für die Interaktion mit T25-' AtpF_{Eco} gemessene Aktivität betrug weniger als das Doppelte der Negativkontrolle. Dies könnte darauf hinweisen, dass hier eine indirekte Interaktion über einen dritten Partner stattfand.

Zusätzlich zu den Proteinen des F_0 -Komplexes wurde der BACTH-Assay auch mit zwei Untereinheiten des F_1 -Komplexes durchgeführt, AtpC_{Eco} und AtpH_{Eco} . AtpH_{Eco} liegt im zusammengebauten Enzym am weitesten von der Membran entfernt. Der Test auf eine mögliche Interaktion diente als Kontrolle, um zu zeigen, dass keine Interaktion zwischen den an AtpI_{Eco} und AtpH_{Eco} fusionierten T18- oder T25-Fragmenten stattfinden kann. Sowohl auf den mit X-Gal versetzten LB-Agarplatten als auch die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität wiesen nicht auf eine Interaktion hin (Tab. 9, Abb. A 3).

AtpC_{Eco} liegt im zusammengebauten Enzymkomplex nahe der Membran. Die Interaktion von AtpI_{Eco} -T18 mit T25-' AtpC_{Eco} , die schon auf den X-Gal-Platten erkennbar war, konnte im β -Galaktosidase-Assay bestätigt werden. Mit 452 *Miller Units* lag die Aktivität 8 Mal über der Negativkontrolle und zeigte damit die höchste Aktivität nach der Interaktion von AtpI_{Eco} mit sich selbst und der Positivkontrolle (Tab. 9, Abb. A 3).

3 Ergebnisse

Um falsch positive Ergebnisse im BACTH-Assay auszuschließen, wurden auf Grundlage eines *Alignments* von AtpI-Sequenzen verschiedener Organismen (Abb. 21) gezielt AS in AtpI_{Eco} ausgetauscht und der Assay wiederholt. Die ersten Austausche wurden von Passian (2014) während ihrer Masterarbeit durchgeführt. Die Auswahl der Sequenzen erfolgte nach den Ergebnissen einer phylogenetischen Studie von Koumandou und Kossida (2014). Aus diesen Sequenzen wurden ausgehend vom erstellten phylogenetischen Stammbaum diejenigen entfernt, die am weitesten von AtpI_{Eco} und AtpI_{Cmet} entfernt waren, bis konservierte Aminosäuren sichtbar wurden (Koumandou und Kossida, 2014; Abb. 21).

Das *Alignment* zeigte konservierte AS, die in *E. coli* auf den Positionen 39, 43, 79 und 82 liegen, sowie Positionen von sehr ähnlichen AS, in *E. coli* die Positionen 49, 75, 83, 90 und 109. Zusätzlich wurden an vier Stellen AS mit schwach ähnlichen Eigenschaften markiert, die sich in *E. coli* an den Positionen 40, 44, 104 und 111 befanden. Zur Orientierung der Lage dieser AS wurden mit dem Programm TMHMM die Topologien der Proteine vorhergesagt und die TMHs in dem *Alignment* grau unterlegt. Trotz der geringen Ähnlichkeit der Sequenzen fällt auf, dass es sich um Membranproteine handelt, für die mit einer Ausnahme 4 TMHs vorhergesagt werden. In diesen Bereichen befindet sich auch ein Großteil der als konserviert oder ähnlich markierten Aminosäuren (Abb. 21).

Auf Grundlage dieses *Alignments* wurden die konservierten AS S39, G43, E79 und K82 in AtpI_{Eco} ausgetauscht. Zusätzlich wurde die nicht konservierte Aminosäure V88 ersetzt. Dies diente als Kontrolle für einen AS-Austausch ohne erwarteten Einfluss auf die Interaktionen von AtpI_{Eco} mit sich selbst und anderen Proteinen.

Serin (S), eine polare AS mit neutraler Gesamtladung und einer kurzen Seitenkette, wurde gegen die nicht polaren neutralen Aminosäuren Leucin (L) und Glycin (G) getauscht. Glycin hingegen wurde gegen die ebenfalls nicht polare und neutrale Aminosäure Valin (V) getauscht und umgekehrt. Glutaminsäure (E) und Lysin (K) wurden jeweils gegeneinander ausgetauscht, da es sich um polare Aminosäuren mit langen Seitenketten handelt. Während die Glutaminsäure eine saure Aminosäure mit negativer Gesamtladung ist, ist Lysin basisch mit einer positiven Gesamtladung (Betts und Russell, 2003).

Der AS-Austausch erfolgte über eine *Quick-Change site-directed mutagenesis* PCR nach dem Protokoll von Zheng *et al.* (2004), beschrieben in Abschnitt 2.2.6. Die verwendeten Primer sind in Tab. 4 aufgeführt. Als *Template* diente pECD1400. Nach Bestätigung des Austausches durch Sequenzierung wurden alle weiteren Plasmide auf Grundlage des pECD1400-Derivates hergestellt.

3 Ergebnisse

Neisseria	-----
Bordetella	-----
Diaphorobacter	-----MAQASSNDKKI-----AS-----ETESEVEDSDFKPLTAQEAREW-----
Rhodoferax	-----MPL-----FE-----FDTDASDEPGFKQLNAEEAQUAL-----
Cupriavidus	MVRDRQQDRSQAGKASGNDRRDERQQDVWRDDDDSAEREVAVDPLSHAEAVKLLGER
Escherichia	-----MS
Citrobacter	-----MMS
Salmonella	-----MS
Enterobacter	-----MS
Klebsiella	-----MS
Proteus	-----MS
Serratia	-----MS
Yersinia	-----MS
Pseudomonas	-----
Vibrio	-----MVAV
Shewanella	-----MSKV
Neisseria	-----MKQIIILQSAVLSICA AVAFVWGFAGF----LSAVGGGLSYLLPTFVAVLL
Bordetella	-----MGLVAA-AIAGVVAGTAAGLSALAGAGAYFLPNALFALR
Diaphorobacter	RSRHPALSVWRIVWQAA---VGAVVALLAWWLTGRLPVAVSAGYGALSUVVPAALFARG
Rhodoferax	RERHPSLSPWRVVVWQAA---VGLLVALGTWGLTQNLVAGASAAYGAMAVILPAALFARG
Cupriavidus	ALRPSRMTPGKVLLAQVAVT-LLSALAWAIFA-HEHAPSGWSALFGGMVVCVPSGFFALR
Escherichia	VSLVSRNVARKLLLVQLLVV-IASGLLF---S-LKDPFWGVSALSGGLAVFLPNVLFMIF
Citrobacter	VSLVSRNVARKLLFIQFLAV-VASGLLF---S-LKDPFWGTSALICGGMVAVFLPNVLFMIF
Salmonella	VSLVSRNVARKLLFIQFLAV-IASGLLF---C-LKDPFWGTSAVCGGLAVFLPNMFLMIF
Enterobacter	VSLVSRNVARKLLFIQFLAV-IASGLLF---S-LKDPFWGTSAVCGGLAVILPNMFLMIF
Klebsiella	VSLVSRNVARKLLFIQFLAV-MASGLLF---S-LKDPFWGTSAVCGGLAVFLPNMFLMIF
Proteus	VSLYSGKVALKLLFIQFMTF-VILSAGF---Y-FKSTDWSFSAFLGGIACWLPNIAFLLL
Serratia	VSLYSGKVARLLFIQFLMTE-VLISAFAF---G-LKSLEWSGSALAGGLAAWLPSTMFMLF
Yersinia	VSLYSGKIARKLLLIQFLMTE-VVLSAVF---G-FRSLEWSASALAGGLAAWLPSTMFMLF
Pseudomonas	--MPSRLPAFRLLLVQLLVV-LVAALSL--WM-SWGFVAGYSGLLGGMIAWLPNCFYAYK
Vibrio	LARQGRELAKRLLLIQFSAV-MVAAAVF--AV-VVNGDWGLSALVGGGIFVIANAVFAGC
Shewanella	LARRGRWSAYKLVMMQAAVA-GGASILF--FV-VWGVQFGYSALAGGSIAVLPNPFVATL
	* . * . :
Neisseria	LK--LFR--GNPFLQSRMFVFGELIKVVLSLLSMLAVFAVWHQSLVFAP-FLMGLLVGSH
Bordetella	LLVNVVR--AA-RPNPFAFLYGLLKLMLTALLLWLLSWLAQGWLVWPA-VLLGLVFTLK
Diaphorobacter	MARRRS---TAGAAMVGLLGLWELVKIALTVAMLAAPRVV-PGLSWLA-LLVGMVVTMK
Rhodoferax	LSRQRR--ANAGSALTGFVWEMVKIALTVAMLI VAPRLI-LGLNWLA-LLAGFVVTMK
Cupriavidus	L-WMSRRQPT-----VGGLVAGEAIKVFSTVALFVLVVVLY-RDLRWIP-MLVTFLLVLK
Escherichia	A-WRHQAHTPAKGRVAWTFAFGEAFKVLAMLVLLVVALAVL-K-AVFLP-LIVTWVLVLV
Citrobacter	A-WRHQAHTPVRGRVAWTFAFGEALKVLAMLVLLVVALAVL-K-AVFLP-LIVTWVLVLV
Salmonella	A-WRHQAHTPAKGRVSWTFAFGEAFKVLAMLVLLVVALAVL-K-AVFLP-LIVTWVLVLV
Enterobacter	A-WRHQAHTPAKGRVAWSFALGEEVCKVLLTFALLVVALAVL-K-VVFLP-LIVTWVLVLV
Klebsiella	A-WRHQAHTPAKGRVAWTFAFGEAFKVLMLTFALLAVALAVL-K-VVFLP-LIVTWVLVLV
Proteus	LRLQVDENEASVRINWLFAPSEGLKVLISIALLLIVALGVF-K-AAFAP-LVMTYLAVLV
Serratia	A-LRHQAQTPAPGRVAWSFAIGEGLKVLITIVLLIVALGVF-K-AAFVP-LGLTYLAVLV
Yersinia	A-CRHQAQTAAPGRVAWSFAIGEGLKVLITIVLLIVALGLF-K-AAFTP-LGLTYLAVLI
Pseudomonas	A-FRFSGA-RAAREIVRSFYAGEAGKLILTAVLFALAFAGV-K-PLMAPALFGVYLLTLM
Vibrio	A-FLFAGA-RALKMVAISFYFGEALKILITIVLFSVAYMYM-Q-LELVP-LNLTYLLALG
Shewanella	A-FSHTGA-SSAAKVIKTFYWGAEVKKLLLTIAMFSLVFINL-K-VAFMP-LFVCYVLTLI
	: * * :
Neisseria	LVFLVLLRVKDYGR-----
Bordetella	G-YLLLLMLRKRS-----
Diaphorobacter	T-YWIALLARPGVRRTD---
Rhodoferax	V-YWVAVWLRPVSRSQSLNKN
Cupriavidus	T-YWVALAIR-----
Escherichia	V-QILAPAVINNKG-----
Citrobacter	V-QILAPAVINNKG-----
Salmonella	V-QILAPAVINNKG-----
Enterobacter	V-QVLAPAVINNKG-----
Klebsiella	V-QVLAPAVINNKG-----
Proteus	M-QVVAPAVING-----
Serratia	V-QIVAPAVINSYRT-----
Yersinia	V-QILAPAVISGYRT-----
Pseudomonas	V-SWCAPLLMGKTFTRP---
Vibrio	I-NICAPVLFINNKK-----
Shewanella	V-HWTAPLYFKQS-----

Abb. 21: Multiple sequence alignment von AtpI verschiedener Organismen.

Das *Alignment* wurde mit CLUSTAL O 1.2.1 erstellt. Die Symbole unter den Sequenzen geben Positionen mit vollständig konservierten (*), sehr (:) oder schwach (.) ähnlichen AS an. Die für Austausch in AtpI_{Eco} verwendeten AS sind fett und rot hervorgehoben, die vorhergesagten TMHs (vorhergesagt mit dem Programm TMHMM 2.0) grau unterlegt. Die VIMSS-Nr. der verwendeten Sequenzen sind in Abschnitt 2.8 aufgeführt.

3 Ergebnisse

Um zu prüfen, ob AtpI_{Eco} mit den ausgetauschten Aminosäuren noch in die Membran integriert, wurden zwei verschiedene Kontrollen durchgeführt. Zum einen wurden die Proteine mit einem N-terminalen Strep-tagTM II in *E. coli* BL21 (DE3) synthetisiert, das Zellmaterial fraktioniert und über eine SDS-PAGE getrennt. Die AS-Austausche G43V, E79K, K82E und V88G sowie erste Tests auf Einbau in die Membran wurden von Passian (2014) während ihrer Masterarbeit durchgeführt. Sie konnte zeigen, dass Strep-AtpI_{Eco} mit den entsprechenden AS-Austauschen in der unlöslichen Fraktion zu finden sind.

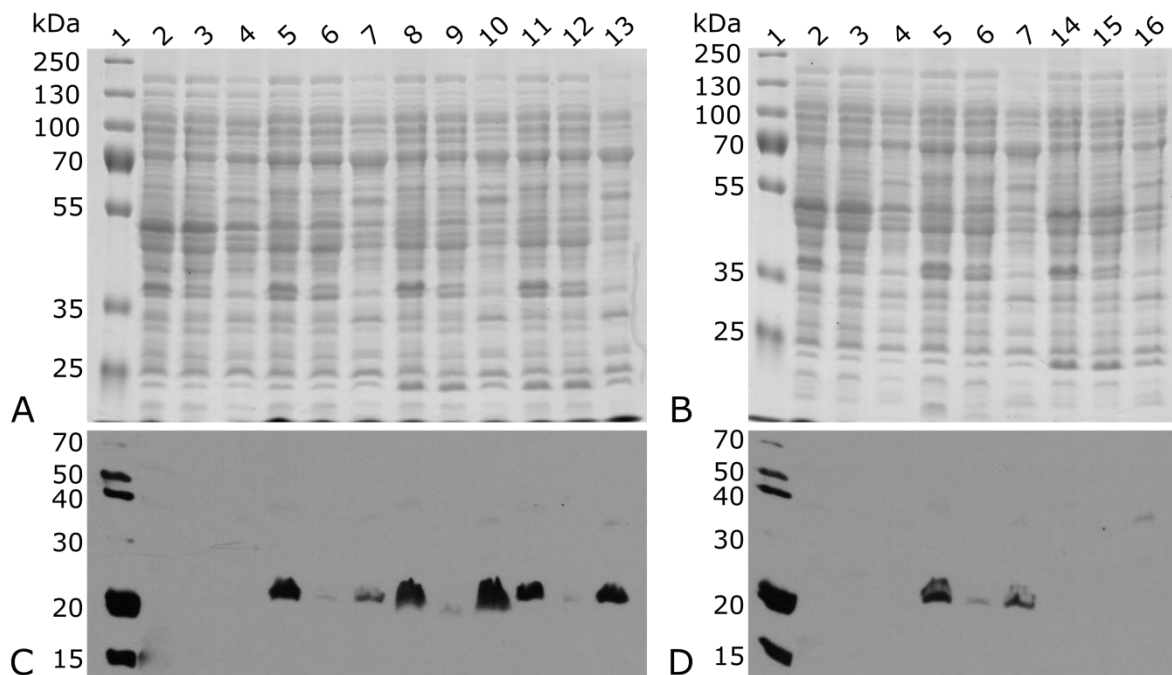


Abb. 22: Lokalisierung von AtpI_{Eco} Mutanten nach der Fraktionierung des Proteinextraktes.

Die *E. coli* BL21 (DE3)-Transformanten mit den Plasmiden pASK-IBA7plus, pECD1588, pECD1527-pECD1529 wurden in LB-Medium bei 30 °C angezogen, bei OD₆₀₀ 0,6±0,1 mit 200 µg/l AHT induziert und 2 h später geerntet. Nach der Fraktionierung wurden die Proben vom Zellaufschluss (2, 5, 8, 11, 14), des Überstandes nach der ersten Ultrazentrifugation (3, 6, 9, 12, 15) sowie des in 1 % DDM gelösten Membranpellets (4, 7, 10, 13, 16) über eine (A, B) SDS-PAGE getrennt. Als Marker diente der *Page RulerTM Plus Prestained Protein Ladder* (1 A, B). Die Identifizierung von Strep-AtpI_{Eco} (4-6), Strep-AtpI_{Eco}^{S39L} (14-16), Strep-AtpI_{Eco}^{S39G} (8-10) und Strep-AtpI_{Eco}^{E79K K82E} (11-13) erfolgte über einen (C, D) Western Blot mit Strep-tagTM-Antikörpern. Die Proben von *E. coli* BL21 (DE3) pASK-IBA7plus (2-4) dienten als Kontrolle. Als Marker diente der *PageRulerTM Unstained Broad Range Protein Ladder* (1 C, D).

In Abb. 22 sieht man die SDS-PAGE und den Western Blot für die Fraktionierung der *E. coli* BL21 (DE3)-Transformanten mit den Plasmiden pECD1527-pECD1529, die entsprechend Strep-AtpI_{Eco}^{S39L}, Strep-AtpI_{Eco}^{S39G} oder Strep-AtpI_{Eco}^{E79K K82E} synthetisierten. Zur Kontrolle wurden die Transformanten mit dem leeren pASK-IBA7plus und pECD1588 für die Synthese

3 Ergebnisse

von Strep-AtpI_{Eco} mitgeführt. In der SDS-PAGE war Strep-AtpI_{Eco} in den einzelnen Fraktionen nicht zu erkennen, dafür aber im Western Blot nach dem Strep-tag®-Nachweis mit Hilfe eines Strep-Tactin®-HRP-Konjugats. Strep-AtpI_{Eco} ohne und mit den AS-Austauschen S39G und E79K K82E konnte in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden. Strep-AtpI_{Eco}^{S39L} hingegen konnte weder in der unlöslichen Fraktion noch im Gesamtzellextrakt detektiert werden (Abb. 22).

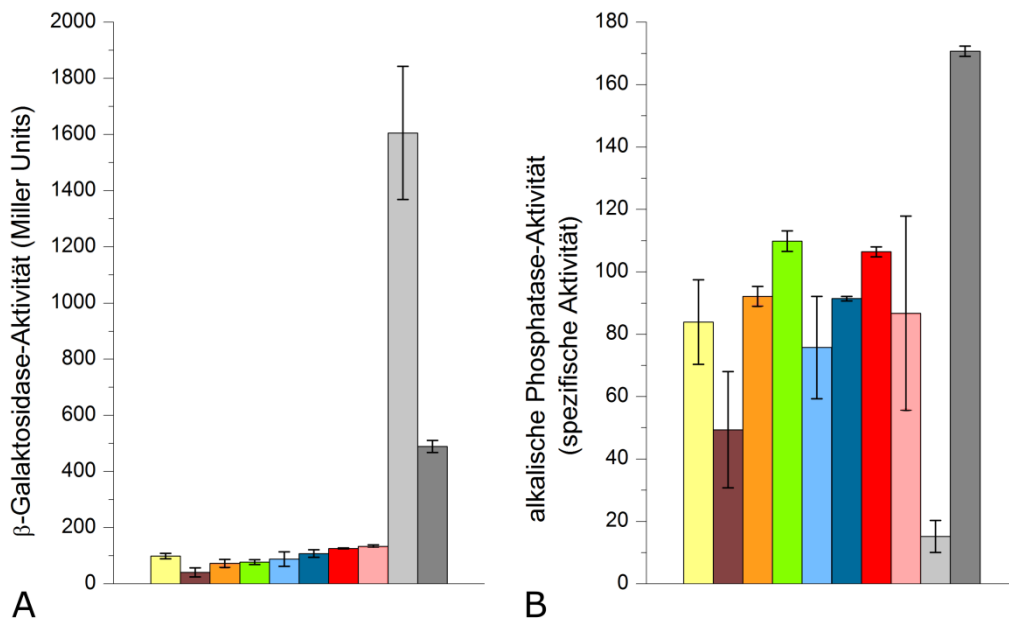


Abb. 23: Die Membrantopologie der AtpI_{Eco} Mutanten.

AtpI_{99Eco}' des Wildtyps (gelb) und mit den AS-Austauschen S39L (braun), S39G (orange), G43V (grün), E79K (hellblau), K82E (blau), E79K K82E (rot) und V88G (hellrot) wurden mit 'LacZ (A) und 'PhoA (B) fusioniert und die entsprechenden Aktivitäten gemessen. Als Kontrolle dienten 'BlaM' (hellgrau) und BlaM'-LacZ/PhoA (grau). Die Abweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

Um zu ermitteln, ob der Einbau der AtpI_{Eco}-Varianten in die Membran korrekt verläuft, wurde die Lokalisierung der Schleife nach der dritten Transmembrandomäne mit Hilfe der Reporteraktivitäten von PhoA und LacZ untersucht. Dafür wurde *E. coli* CC118 mit pGP1-2 und einem der Plasmide pECD1512, pECD1514, pECD1516, pECD1518, pECD1520, pECD1522 oder pECD1524 wie zuvor beschrieben angezogen und die Aktivitäten der Alkalischen-Phosphatase bzw. der β-Galaktosidase ermittelt. Die Aktivitäten fast aller Fusionsproteine mit den AtpI_{Eco} Mutanten entsprachen denen des Wildtyp AtpI_{Eco}. Nur AtpI_{99Eco}^{S39L}-PhoA bildete eine Ausnahme. Die Alkalische-Phosphatase-Aktivität dieses Proteins war niedriger, betrug aber das Dreifache der Negativkontrolle (Abb. 23). Grund für die geringere Aktivität könnte eine verringerte Stabilität des Fusionsproteins sein (vergl. Abb.

3 Ergebnisse

22). Somit konnte der BACTH-Assay mit allen $AtpI_{Eco}$ Mutanten durchgeführt werden. Die optischen Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefasst und im Detail in Abb. A 3 und Abb. A 4 zu sehen.

In Abb. 24 und Tab. 9 sind die für den BACTH-Assay ermittelten β -Galaktosidase-Aktivitäten dargestellt. Die Aktivität mit der Kombination von $AtpI_{Eco}$ -T18 mit $T25$ '- $AtpI_{Eco}^{S39L}$ lag mit 406 *Miller Units* deutlich unter der für die Selbstinteraktion von $AtpI_{Eco}$ ermittelten Aktivität. Alle anderen Kombinationen führten zu β -Galaktosidase-Aktivitäten von weniger als 100 *Miller Units*, was darauf hinweist, dass keine Interaktion stattfand (Abb. 24). Die geringen Aktivitäten können mit der zuvor beobachteten Instabilität von $AtpI_{Eco}^{S39L}$ erklärt werden (vergl. Abb. 22).

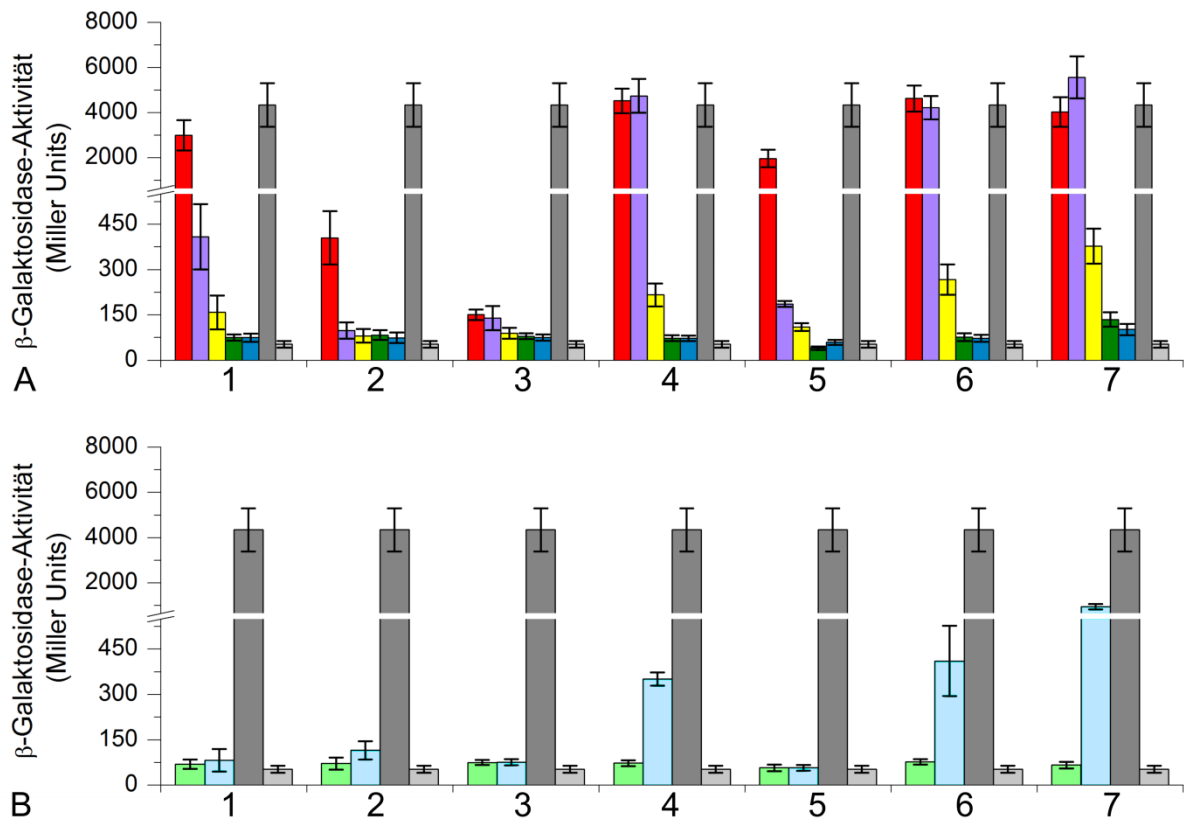


Abb. 24: Protein-Protein-Interaktionen mit $AtpI_{Eco}$ -Mutanten.

Es wurde die Interaktion von $AtpI_{Eco}$ -Mutanten mit Untereinheiten des (A) F_0 - und des (B) F_1 -Komplexes getestet. Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde von den Transformanten mit der optisch stärksten Blaufärbung auf X-Gal haltigen LB-Agar Platten ermittelt. Die getesteten Transformanten synthetisierten die Fusionsproteine $T25$ '- $AtpI_{Eco}^X$ und $AtpI_{Eco}$ '-T18 (rot), $T25$ '- $AtpI_{Eco}^X$ und $AtpI_{Eco}^X$ '-T18 (lila), $T25$ '- $AtpI_{Eco}^X$ und $AtpB_{Eco}$ '-T18 (gelb), $T25$ '- $AtpI_{Eco}^X$ und $AtpE_{Eco}$ '-T18 (grün), $AtpI_{Eco}^X$ '-T18 und $T25$ '- $AtpF_{Eco}$ (blau), $AtpI_{Eco}^X$ '-T18 und $T25$ '- $AtpH_{Eco}$ (hellgrün), $AtpI_{Eco}^X$ '-T18 und $T25$ '- $AtpC_{Eco}$ (hellblau), $CynS$ '-T18 und $T25$ '- $CynS$ (grau), T18 und T25 (hellgrau). Dabei steht X jeweils für den AS-Austausch S39G (1), S39L (2), G43V (3), E79K (4), K82E (5), E79K K82E (6), V88G (7). Die Abweichungen von mindestens fünf unabhängigen Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

3 Ergebnisse

Im Unterschied zum Austausch S39L führte der Austausch S39G zu einer Aktivität von 408 *Miller Units* für die Selbstinteraktion und 3003 *Miller Units* für die Kombination mit AtpI_{Eco} . Diese Interaktionen waren weniger stabil als die des Wildtyps, lagen aber deutlich über der Negativkontrolle mit dem T18- und T25-Fragment allein. Außerdem interagierte AtpI_{Eco}^{S39G} mit AtpB_{Eco} , wobei die gemessene β -Galaktosidase-Aktivität unter der des Wildtyps lag. Mit anderen Untereinheiten der F_1F_0 -ATPase konnte keine Interaktion ermittelt werden (vergl. Abb. 20 B und Abb. 24 B 2).

Einen deutlichen Unterschied zum Wildtyp konnte man bei dem Tausch des Glycins an Position 43 gegen Valin erkennen. Das Protein interagierte schwach mit sich selbst und zeigte nur sehr geringe Aktivitäten in Kombination mit AtpI_{Eco} . Interaktionen der F_1F_0 -ATPase-Untereinheiten mit der Mutante AtpI_{Eco}^{G43V} konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 24 A und B 3).

AtpI_{Eco}^{E79K} und $\text{AtpI}_{Eco}^{E79K K82E}$ verhielten sich im BACTH-Assay sehr ähnlich und zeigten auch keine Unterschiede zu den Interaktionen von AtpI_{Eco} mit den getesteten Proteinen. Ein deutlicher Widerspruch bestand nur zwischen dem optischen Ergebnis und der β -Galaktosidase-Aktivität bei der Interaktion von $\text{AtpI}_{Eco}^{E79K K82E}$ mit AtpC (vergl. Abb. 20 B und Abb. 24 A und B 4 und 6, Tab. 9). Der einzelne Austausch von K82 zu Glutaminsäure führte hingegen zu einer geringeren β -Galaktosidase-Aktivität bei der Interaktion mit AtpI_{Eco} und sich selbst sowie einem Verlust der Interaktion mit AtpB_{Eco} und AtpC_{Eco} (Abb. 24 5).

Der Tausch der nicht konservierten AS Valin an Position 88 zu Glycin führte im Gegensatz zu allen anderen AS-Austauschen zu gegenüber den Interaktionen des Wildtyp-Proteins erhöhten β -Galaktosidase-Aktivitäten bei der Interaktion mit AtpB_{Eco} und AtpC_{Eco} (vergl. Abb. 20 B und Abb. 24 A und B 7).

Durch den BACTH-Assay wurde deutlich, dass AtpI_{Eco} nicht nur mit AtpE_{Eco} interagiert, sondern auch eine Interaktion mit weiteren Untereinheiten der F_1F_0 -ATPase möglich ist. Dazu gehören AtpB_{Eco} und AtpC_{Eco} . Auffällig ist, dass Mutationen in AtpI_{Eco} , welche die Multimerbildung beeinflussen, auch einen negativen Effekt auf die Interaktion mit AtpB_{Eco} und AtpC_{Eco} haben (Abb. 24; Tab. 9). Es muss aber noch geklärt werden, ob die im BACTH-Assay ermittelten Aktivitäten auf einer direkten Interaktion oder räumlicher Nähe beruhen.

3.3.4 Experimentelle Ermittlung von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* (*Pulldown-Assay*)

Um die im BACTH-Assay ermittelte Interaktion von AtpI_{Eco} mit AtpC_{Eco} *in vitro* zu bestätigen, wurde ein *Pulldown-Assay* durchgeführt. Die Untersuchung beruht darauf, dass ein mit einem *tag* versehenes Protein A an eine Säulenmatrix bindet. Das mit einem anderen *tag* fusionierte Protein B, welches nicht an dieses Säulenmaterial bindet, wird dazugegeben und das Säulenmaterial mit Puffer gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Wenn Protein A und B interagieren, kann man sie zusammen von dem Säulenmaterial eluieren.

Für dieses Experiment wurde AtpI_{Eco} mit einem *Strep-tag*® II am N-Terminus und AtpC_{Eco} mit einem N-terminalen *His-tag* fusioniert. Die Proteine wurden getrennt voneinander in *E. coli* BL21(DE3) mit pECD1588 bzw. pECD1586 synthetisiert, gereinigt und über eine SDS-PAGE analysiert (Abb. A 5 A, B). Im Anschluss wurde der Puffer ausgetauscht, um die für die Elution vom Säulenmaterial verwendeten Chemikalien Desthiobiotin und Imidazol zu entfernen, bevor sie für den *Pulldown-Assay* eingesetzt wurden.

Da beide Proteine mit jeweils unterschiedlichen *tags* fusioniert waren, wurde der *Pulldown-Assay* sowohl mit *Strep-Tactin*® als auch mit Ni-NTA-Material durchgeführt. Im Folgenden ist die Durchführung des Experiments anhand der Verwendung des Ni-NTA-Materials dargestellt. Zunächst wurde His-AtpC_{Eco} geladen um eine Bindung des Proteins an die Ni-NTA-Matrix zu ermöglichen und überschüssiges Protein in zwei Waschschrritten entfernt. Danach wurde der Ansatz mit Strep-AtpI_{Eco} inkubiert, um eine Interaktion zwischen den Proteinen zu ermöglichen. Nicht gebundenes Protein wurde in 6 Waschschrritten entfernt. Zum Schluss wurden die verbliebenen Proteine eluiert und über eine SDS-PAGE und einen Western Blot analysiert. In jedem Durchlauf gab es drei verschiedene Ansätze. Im ersten wurde nur His-AtpC_{Eco} geladen, um die Bindung von His-AtpC_{Eco} an das Ni-NTA-Material zu zeigen. Im zweiten wurden His-AtpC_{Eco} und Strep-AtpI_{Eco} geladen um auf eine Protein-Protein-Interaktion zu testen und im dritten Ansatz wurde Strep-AtpI_{Eco} hinzugegeben, um zu prüfen, ob der potentielle Interaktionspartner selbst an die Ni-NTA binden kann. In den Ansätzen, in denen nur ein Protein geladen wurde, wurde das zweite durch die äquivalente Menge Puffer ersetzt.

In der SDS-PAGE und im Western Blot wurde sichtbar, dass Strep-AtpI_{Eco} allein an die Ni-NTA bindet und somit keine Aussage über eine Interaktion mit His-AtpC_{Eco} getroffen werden kann (Abb. 25 und Abb. A 6)

3 Ergebnisse

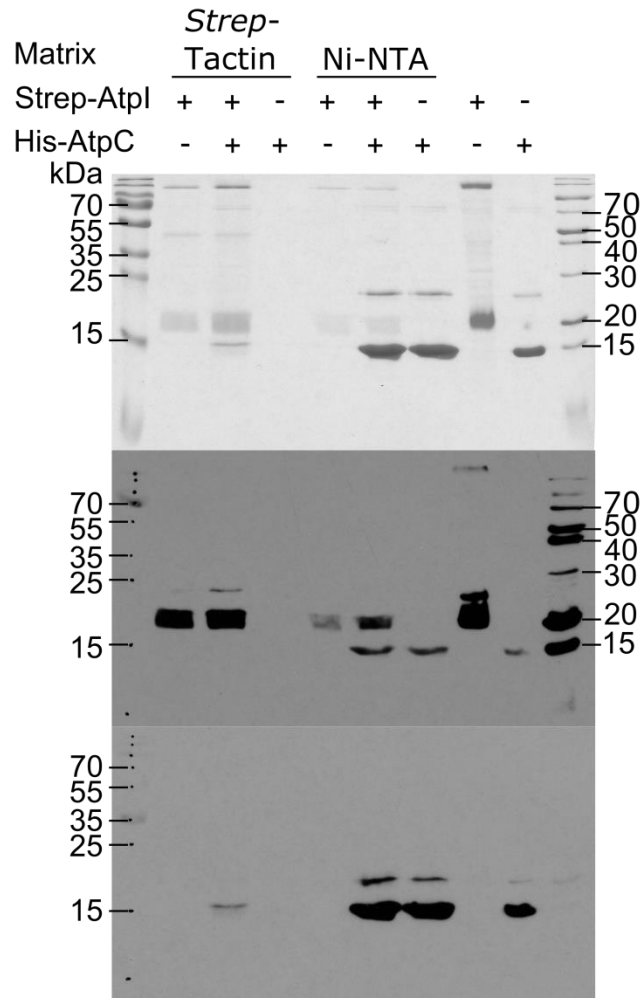


Abb. 25: Die Interaktion von Strep-AtpI_{Eco} und His-AtpC_{Eco} *in vitro*.

Mit den gereinigten Proteinen Strep-AtpI_{Eco} und His-AtpC_{Eco} wurde ein *Pull-down-Assay* durchgeführt. Sie wurden in verschiedenen Kombinationen mit den Matrizes Strep-Tactin® oder Ni-NTA inkubiert, nicht gebundenes Protein herunter gewaschen und die verbliebenen Proteine eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden über eine SDS-PAGE getrennt (oben) und die Proteine auf einem Western Blot mit Hilfe des Strep-Tactin®-HRP Konjugats (mitte) oder des Anti His-Antikörpers (unten) identifiziert. Die in jedem Ansatz verwendeten Proteine sind mit einem + gekennzeichnet. Die zwei vorletzten Spuren enthalten jeweils die gereinigten Proteine. Als Proteinstandards dienten der *Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder* (links) und der *PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder* (rechts).

Bei der Verwendung von *Strep-Tactin*® wurden in Anlehnung an die Durchführung mit Ni-NTA zunächst Strep-AtpI_{Eco} beziehungsweise eine äquivalente Menge an Puffer und anschließend His-AtpC_{Eco} oder Puffer geladen. Nicht gebundenes Protein wurde durch die Waschschrte entfernt. Während Strep-AtpI_{Eco} wie erwartet an das Material gebunden hatte, wurde His-AtpC_{Eco} herunter gewaschen (Abb. 25 und Abb. A 5 F, E). Damit wurde gezeigt, dass die Verwendung von *Strep-Tactin*® für den Nachweis einer Interaktion von Strep-AtpI_{Eco} mit His-AtpC_{Eco} geeignet ist. In Abb. 25 sieht man, dass Strep-AtpI_{Eco} und His-AtpC_{Eco} zusammen vom *Strep-Tactin*®-Material eluiert wurden. Im Western Blot konnte die

3 Ergebnisse

Identität der Proteine verifiziert werden. Die auf Grundlage der Ergebnisse des BACTH-Assays postulierte Interaktion von AtpI_{Eco} mit AtpC_{Eco} ließ sich damit *in vitro* bestätigen.

In Kapitel 3.3 wurde gezeigt, dass es sich bei AtpI_{Eco} um ein Membranprotein handelt, dessen N- und C-Terminus ins Zytoplasma ragen. Das Protein ist in der Zelle über die ganze Membran verteilt und interagiert *in vivo* mit sich selbst sowie Untereinheiten der F₁F_o-ATPase, darunter AtpB_{Eco} und AtpC_{Eco}. Die Interaktion mit AtpC_{Eco} konnte *in vitro* bestätigt werden.

3.4 Welche physiologische Rolle spielt *atpI*_{Eco}?

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass AtpI_{Eco} mit AtpC_{Eco} interagiert. Da AtpC_{Eco} die Aktivität der F₁F_o-ATPase reguliert (Kato *et al.*, 1997; Kato-Yamada *et al.*, 1999), könnte AtpI_{Eco} eine Rolle bei hohem oder niedrigem pH-Wert spielen. In ihrer Masterarbeit testete Nicole Passian das Wachstum von BW25113 und ECB178 bei pH 6.0, pH 7.0 oder 8.0 in LB-Medium, TMM_{Gluc} oder TMM_{Succ}. Das Wachstum beider Stämme verlief unter allen getesteten Bedingungen gleich (Passian, 2014). Daher bestand die Frage, ob *atpI*_{Eco} eine Rolle bei pH-Änderungen während des Wachstums spielen könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurde getestet wie sich das Wachstum von BW25113 und der *atpI*_{Eco}-Deletionsmutante ECB178 bei pH-Wechsel des Anzuchtmediums verhält.

Für die Durchführung der Wachstumsmessungen wurden die Stämme in TMM_{Gluc} pH 6.0 oder 8.0 für 16 h bei 37 °C geschüttelt. Mit dieser Kultur wurde frisches Medium des gleichen pH-Wertes auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und weitere 2 h bei 37 °C geschüttelt. Für den pH-Wechsel des Mediums wurden je 2 Mal 100 µl Kultur pelletiert und einmal in 500 µl frischem TMM_{Gluc} pH 6.0 und einmal in TMM_{Gluc} pH 8.0 suspendiert. Davon wurden je 100 µl Zellkultur zu 100 µl frischen Mediums mit gleichem pH-Wert in 96 *well* Mikrotiterplatten pipettiert. Somit wurde jeweils ein Teil der Zellen in Medium des gleichen pH-Wertes angeimpft und der andere erfuhr einen pH-Wechsel. Die Platte schüttelte mit 1200 rpm bei 37 °C im Tecan infinite M200, das in regelmäßigen Intervallen die OD₆₀₀ maß.

Das Überführen der Zellen zum gleichen Medium diente der Kontrolle, ob die Behandlung der Stämme einen Einfluss auf ihr Wachstum hat. In TMM_{Gluc} pH 6,0 waren die Verdopplungszeiten niedriger und die Stämme erreichten die stationäre Phase früher als in TMM_{Gluc} pH 8,0 (Abb. 26 A, D, Tab. A 1). Bei gleichbleibendem pH-Wert war aber kein

3 Ergebnisse

Unterschied im Wachstum der Stämme untereinander zu erkennen. Auch der Wechsel von pH 6.0 zu pH 8.0 zeigte keinen Effekt (Abb. 26 A-C). Bei umgekehrtem pH-Wechsel ging ECB178 jedoch früher in die stationäre Phase ein und sein Wachstum stagnierte bei einer geringen OD₆₀₀ (Abb. 26 D).

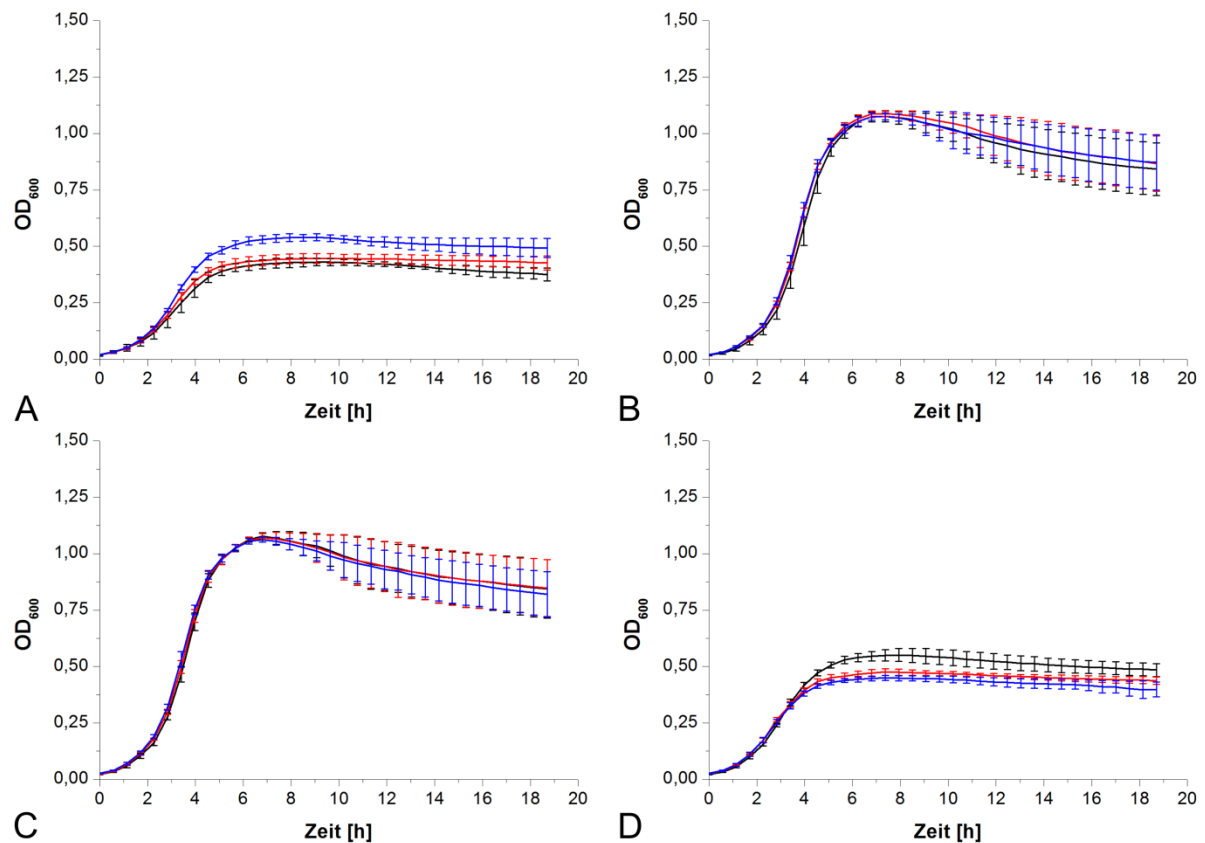


Abb. 26: Wachstum unter pH-Stress.

Die Stämme *E. coli* BW25113 (schwarz), ECB178 ($\Delta atpI$; rot) und ECB179 ($\Delta atpI$, $glmS::atpIp-atpI$; blau) wurden entweder in der Vor- und Mittelkultur in TMM_{Gluc} pH 6,0 angezogen und in der Hauptkultur in TMM_{Gluc} pH 6,0 (A) oder pH 8,0 (B) oder sie wuchsen in Vor- und Mittelkultur in TMM_{Gluc} pH 8,0 und in der Hauptkultur in TMM_{Gluc} pH 8,0 (C) oder pH 6,0 (D). Die Glukosekonzentration in TMM_{Gluc} betrug 0,5 mM. Die Abweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

Damit ausgeschlossen werden kann, dass zu beobachtende Effekte sekundäre Ursachen haben und nicht auf der Deletion von *atpI*_{Eco} beruhen, wurde das Gen unter Kontrolle des eigenen Promotors unter Verwendung des Protokolls von Choi und Schweizer (2006) in die *attTn7 site* stromabwärts von *glmS*_{Eco} ins Chromosom von BW25113 $\Delta atpI$ eingeführt. Die Integration wurde mittels PCR bestätigt. Der dabei hergestellte Stamm ECB179 komplementierte diesen Phänotyp aber nicht. Zudem wuchs er bei pH 6.0 schneller als die beiden anderen Stämme und erreichte bei Eintritt in die stationäre Phase eine höhere OD₆₀₀

3 Ergebnisse

(Abb. 26 A, D). Da sich der Stamm auch unter der Kontrollbedingung nicht wie der Wildtyp verhielt, wurde er in den Folgeexperimenten nicht verwendet.

Um herauszufinden, ob Glukose für das Wachstum von ECB178 ein limitierender Faktor war und dieser Stamm deshalb früher stagnierte, wurde das Experiment mit 0,25 mM Glukose im Medium wiederholt. Ohne pH-Änderung war kein Unterschied im Wachstum zu sehen. Bei dem Wechsel von Medium mit pH 8,0 auf pH 6,0 wuchsen beide Stämme etwa bis zu einer OD_{600} von 0,5. Damit erreichte ECB178 eine etwas höhere OD_{600} als in TMM mit 0,5 mM Glukose (vergl. Abb. 26 D, Abb. 27 B, Tab. A 1, Tab. A 2). Mit Erhöhung der Glukosekonzentration auf 1 mM zeigten die Stämme den gleichen Wachstumsunterschied wie schon mit 0,5 mM Glukose (vergl. Abb. 26 C, D, Abb. 27 C, D, Tab. A 1, Tab. A 2). Glukose schien das Wachstum von ECB178 demnach negativ zu beeinflussen.

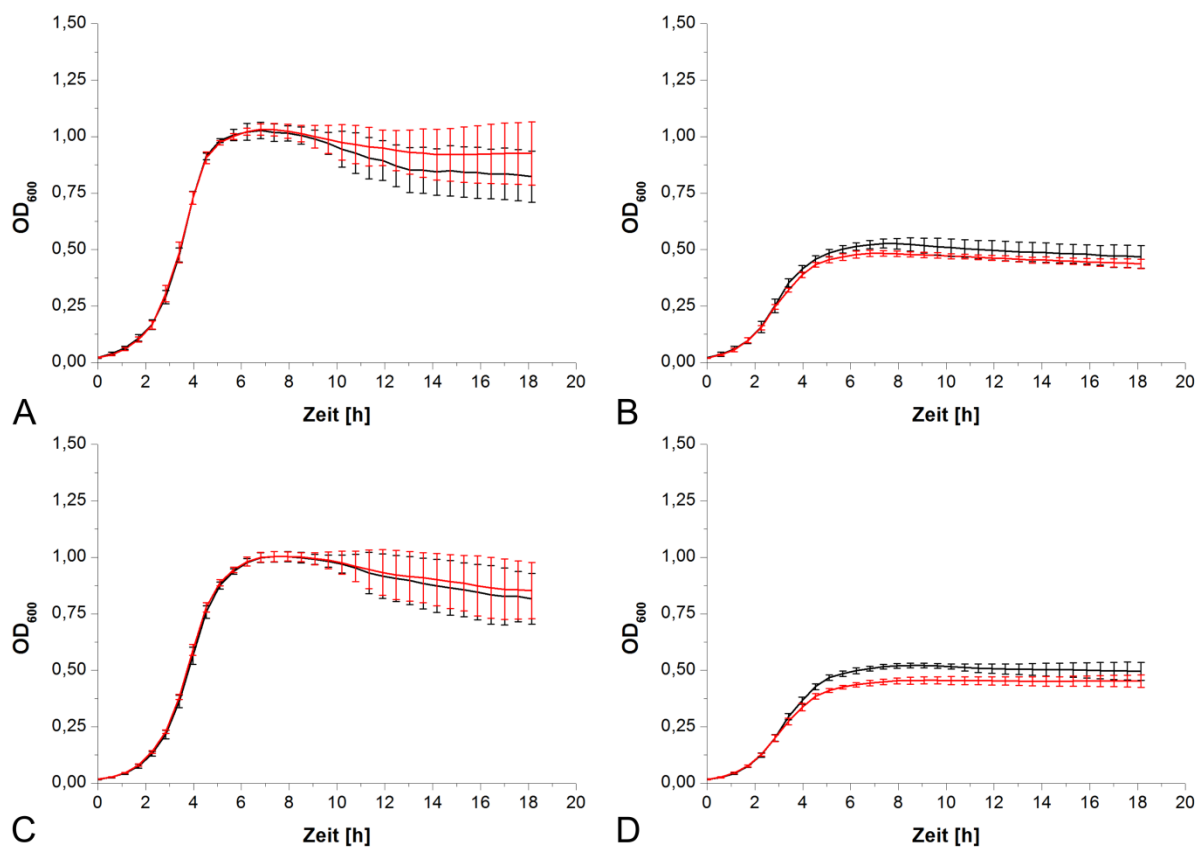


Abb. 27: Wachstum unter pH-Stress bei unterschiedlicher Glukosekonzentration.

Die Stämme *E. coli* BW25113 (schwarz) und ECB178 (rot) wurden in der Vor- und Mittelkultur in TMM_{Gluc} pH 8,0 angezogen und in der Hauptkultur in TMM_{Gluc} pH 8,0 (A, C) oder pH 6,0 (B, D). Die Konzentration an Glukose im Medium betrug 0,25 mM (A, B) oder 1 mM Glukose (C, D). Die Abweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

3 Ergebnisse

Da eine Änderung des pH-Wertes im Medium einen Einfluss auf das Wachstum von ECB178 zu haben schien, wurde der Einfluss eines erhöhten Protoneneinstroms in die Zelle durch die Verwendung von 2,4-Dinitrophenol (DNP) getestet. Bei DNP handelt es sich um ein Ionophor, das Protonen über die Membran diffundieren lässt und damit den Protonengradienten aufhebt, der von der F_1F_0 -ATPase für die ATP-Synthese benötigt wird (McLaughlin, 1972; Mitchell, 1966).

Als Anzuchtmedium wurde hier TMM_{Gluc} pH 7.0 verwendet. Die Durchführung des Experimentes erfolgte wie zuvor, mit dem Unterschied, dass statt eines Mediumwechsels 100 μ l der zweiten Vorkultur in frischem Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen DNP verdünnt und anschließend das Wachstum über die Zeit gemessen wurde. Da DNP in Ethanol gelöst wurde, wurde zur Kontrolle das Wachstum mit den gleichen Ethanol-Konzentrationen wiederholt. Um auch den Einfluss von Ethanol auf das Wachstum zu testen wurde als zweite Kontrolle das Wachstum ohne Zugabe von Ethanol gemessen.

Wie schon in früheren Experimenten beobachtet, wuchsen BW25113 und ECB178 in TMM_{Gluc} pH 7.0 gleich schnell und erreichten die gleiche OD_{600} beim Übergang in die stationäre Phase (Abb. 28; Passian, 2014). Mit steigender Konzentration an Ethanol veränderte sich die Wachstumsrate nicht, die Stämme erreichten aber früher die stationäre Phase (Abb. 28 B, D, F; Tab. A 3). Vergleicht man das Wachstum beider *E. coli* Stämme erkennt man, dass sich die Verdopplungszeit mit steigender Konzentration an Ethanol erhöhte und die OD_{600} beim Eintritt in die stationäre Phase sank. Gleiches ließ sich auch mit steigender DPN-Konzentration beobachten, wobei Wachstumsgeschwindigkeit und Höhe der erreichten OD_{600} niedriger waren im Vergleich zur entsprechenden Ethanol-Konzentration. Untereinander unterschieden sich die *E. coli* Stämme nicht im Wachstum (Abb. 28).

ECB178 zeigt im Vergleich zum Wildtyp ein vermindertes Wachstum bei einem Mediumwechsel von pH 8,0 zu pH 6,0. Dieser Effekt lässt sich mit geringerer Glukosekonzentration aufheben und mit höherer Glukosekonzentration steigern. Er lässt aber nicht durch einen gestörten Protonengradienten, hervorgerufen durch das Ionophor DNP, auslösen.

3 Ergebnisse

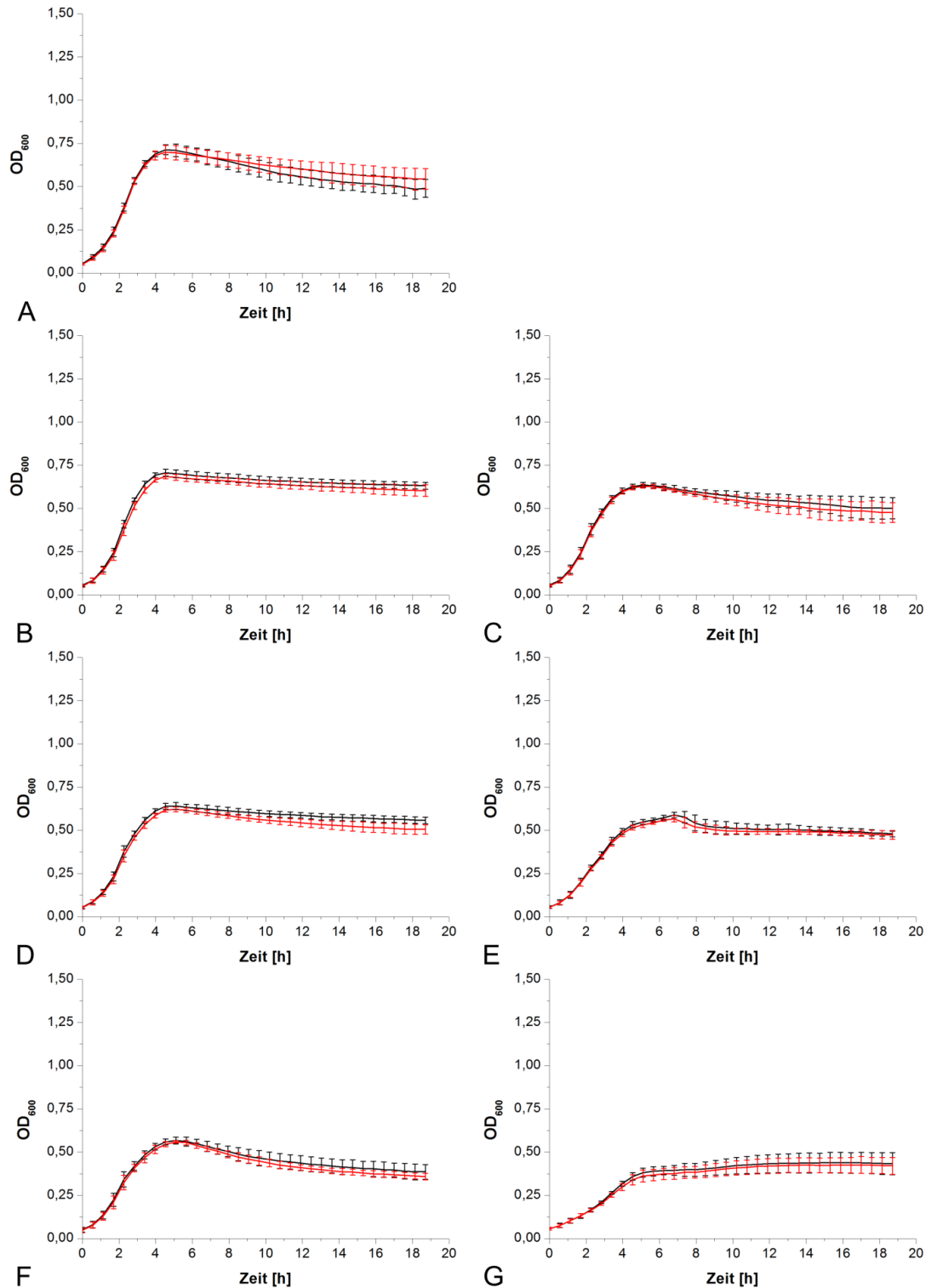


Abb. 28: Der Einfluss von DNP auf das Wachstum.

Die Stämme *E. coli* BW25113 (schwarz) und ECB178 (rot) wurden in TMM_{Gluc} pH 7,0 angezogen und in der Hauptkultur 1:2 in TMM_{Gluc} pH 7,0 ohne (A) oder mit DNP bzw. Ethanol verdünnt. Die DNP-Konzentration betrug 0,2 mM (C), 0,5 mM (E) oder 0,75 mM (G). Entsprechend der mit DNP zugesetzten Konzentration an Ethanol wurde dem Medium 0,7 % (B), 1,75 % (D) oder 2,625 % [v/v] Ethanol (F) zugefügt. Die Abweichungen von mindestens drei unabhängigen Messungen sind durch Fehlerbalken wiedergegeben.

4 Diskussion

Obwohl *atpI* schon 1981 entdeckt wurde (Gay and Walker, 1981a), ist seine Funktion und Bedeutung bis heute unbekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Einblicke in die Expression des *atp*-Operons von *E. coli* und *C. metallidurans*. Die Untersuchung der Membran-Topologie von AtpI_{Eco} , sowie des Verhältnisses zur F_1F_0 -ATPase und der Interaktion mit Untereinheiten des Enzyms deckten neue Erkenntnisse zur Funktionsweise von AtpI_{Eco} auf. Wachstumsexperimente zeigten eine mögliche physiologische Bedeutung von AtpI_{Eco} . In diesem Kapitel werden die Ergebnisse diskutiert.

4.1 Die Aktivität der *atp_{Eco}*-Promotoren

Die F_1F_0 -ATPase macht etwa 1,5-2 % der Gesamtproteinmenge in *E. coli* aus. Dies bedeutet, dass rund 3200 Komplexe pro Zelle vorliegen (Von Meyenburg *et al.*, 1984). Transkription und Translation müssen folglich hocheffizient ablaufen.

In *E. coli* erfolgt die Transkription hauptsächlich von einem starken Promotor stromaufwärts von *atpI* (Abb. 6-Abb. 8; Gay und Walker, 1981a; Kanazawa *et al.*, 1982; Nielsen *et al.*, 1984). Die Aktivität der Promotoren innerhalb von *atpI_{Eco}* ist deutlich geringer als die des ersten Promotors (Abb. 6; Von Meyenburg *et al.*, 1982; Porter *et al.*, 1983). Da sie sich gegenseitig zu behindern scheinen, spielen sie *in vivo* vermutlich eine untergeordnete Rolle, auch wenn ihre Existenz zweifelsfrei nachgewiesen wurde (Von Meyenburg *et al.*, 1982; Porter *et al.*, 1983). Die Aktivität der einzelnen Promotoren unterscheidet sich nicht von der beider Promotoren zusammen und sie haben auch keinen Einfluss auf den *atpIp* (Abb. 6). Die geringe Wirkung der Kohlenstoffquelle und des pH-Wertes auf *atpBp₁* und *atpBp₂* zeigt, dass die Promotoren unter diesen Bedingungen ebenfalls keine bedeutende Rolle spielen (Abb. 7 B, Abb. 8 B). Die Ergebnisse bestätigen außerdem die Existenz der Stamm-Schleifen-Strukturen stromabwärts dieser Promotoren. Vor allem die Stamm-Schleifen-Struktur hinter *atpBp₂* hat einen negativen Einfluss auf die Aktivität dieses Promotors (Abb. 6, Abb. 7 B, Abb. 8 B). Die unterschiedlich starke Expression mit und ohne Stamm-Schleifen-Struktur könnte aber auch mit der RNase E-Schnittstelle erklärt werden. Der geringere Effekt der Stamm-Schleifen-Strukturen stromabwärts von *atpBp₁* könnte daher rühren, dass die RNase E-Schnittstelle wegen des in ihr liegenden Transkriptionsstarts noch fast vollständig in pECD1282 vorhanden ist, jedoch nicht in pECD1283 (Nielsen *et al.*, 1984; Abb. 2, Tab. 5). Ein Vergleich der Aktivitäten translationaler Fusionen mit und ohne Stamm-Schleifen-

4 Diskussion

Strukturen zeigt allerdings, dass sie ebenso wie die Endonuklease-Schnittstellen (McCarthy *et al.*, 1991; Schaefer *et al.*, 1989) keine Rolle in der posttranskriptionalen Regulation der Expression von *atpI_{Eco}* spielen (Abb. 9). Ein Hinweis auf die Rolle der Stamm-Schleifen-Strukturen und/oder Promotoren innerhalb von *atpI_{Eco}* findet sich bei Hsu und Brusilow (1995). Sie erkannten, dass das 3'-Endes von *atpI_{Eco}* Einfluss auf die Expression des nachfolgenden Gens *atpB_{Eco}* hat.

Da *AtpC_{Eco}* den Zusammenbau der F_1F_0 -ATPase abschließt (Hilbers *et al.*, 2013), könnte ein Promotor direkt vor *atpC_{Eco}* dessen Transkription sicherstellen und damit auch dessen Translation ermöglichen. Der von Huerta und Collado-Vides (2003) postulierte Promotor vor *atpC_{Eco}* spielt *in vivo* vermutlich keine Rolle, da seine Aktivität noch um ein Vielfaches niedriger als die von *atpBp₁* und *atpBp₂* ist und er weder von den getesteten C-Quellen noch von unterschiedlichen pH-Werten abhängig war (Abb. 6-Abb. 8). Seine Existenz muss allerdings aufgrund der Charakteristika von pRS551 angezweifelt werden. Die Hersteller des Plasmids geben an, dass jedes vor *lacZ* klonierte DNA-Fragment in einem geringen aber signifikanten Level an β -Galaktosidase-Aktivität resultiert (Simons *et al.*, 1987). Darauf kann auch die erhöhte Aktivität von *atpCp_{Eco}* zurückgeführt werden, die signifikant über den mit Literaturwerten übereinstimmenden β -Galaktosidase-Hintergrundaktivitäten lag (Abb. 6-Abb. 8; Simons *et al.*, 1987). Denselben falsch-positiven Effekt beobachtete auch Hoffmann (2013), wobei sie eine 2,8-fache Aktivität des *atpCp_{Eco}* gegenüber einer unspezifischen Kontrolle feststellte.

In einer früheren Studie wurde eine von der C-Quelle unabhängige Expression des *atp*-Operons beobachtet (Kasimoglu *et al.*, 1996). Dies steht im Widerspruch zu dem hier ermittelten Einfluss der C-Quelle auf die Promotoraktivitäten (Abb. 7). Sie entsprach jedoch auch nicht der in *Vibrio parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* auftretenden Senkung der Transkription des *atp*-Operons um 40 % in Gegenwart von Glukose, die auf eine cAMP gesteuerte Katabolitrepression zurückgeht (Sakai-Tomita *et al.*, 1992). Steht *E. coli* nur Succinat als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, erfolgt die ATP-Gewinnung ausschließlich über die F_1F_0 -ATPase (Unden und Kleefeld, 2004). Da Glycerin durch die Umwandlung über Glycerin-3-Phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat in die Glykolyse eingeht (Anderson und Wood, 1969; Asnis und Brodie, 1953; Booth, 2005), erfolgt die ATP-Gewinnung aus Glukose und Glycerin über Glykolyse (Anderson und Wood, 1969; Romano und Conway, 1996) sowie die F_1F_0 -ATPase (Meléndez-Hevia *et al.*, 1996; Rich, 2003). Auch in *E. coli* hätte man bei

4 Diskussion

einem Einfluss der C-Quelle auf die Promotoraktivität gegenüber der Aktivität mit Glukose oder Glycerin im Wachstumsmedium einen Anstieg bei Zugabe von Succinat erwartet. Die gegenüber *atpIp_{Eco}* erhöhte Aktivität von *atpIpatpBp₁Bp_{2Eco}* in Gegenwart von Succinat beruht nicht auf einer Aktivitätszunahme von *atpBp₁Bp_{2Eco}* (vergl. Abb. 7 A und B). Die hohen Standardabweichungen in TMM_{Succ} und TMM_{Glyc} (Abb. 7 A) könnten in Kombination mit der verminderten Vitalität der Zellen, die sich nach einem Tag bei Raumtemperatur oder 4 °C zeigte (Daten nicht gezeigt), auf sekundäre Effekte hindeuten. Möglicherweise verursacht das verwendete Plasmid pRS551, auf dem neben *lacZ*, dem Gen für die β -Galaktosidase, auch die Gene *lacY* und *lacA* unter die Kontrolle des zu untersuchenden Promotors gestellt werden, Stress in den Zellen (Simons *et al.*, 1987). Padan *et al.* (1983) zeigten, dass die Überproduktion der von *lacY* kodierten *lac* Permease, ausgelöst durch einen starken Promotor wie *atpIp*, toxisch ist, was das Verhalten der Transformanten erklären könnte. Die Expression wurde noch dadurch verstärkt, dass es sich bei pRS551 um ein *high copy*-Plasmid handelt (Simons *et al.*, 1987). Dieser Effekt könnte untersucht werden, indem ein stark induzierbarer Promotor in das Plasmid integriert und die Aktivität bei steigender Induktion verglichen wird.

Um die negativen Eigenschaften von pRS551 zu umgehen, sollte in zukünftigen Experimenten ein anderes Reporter-gen, wie das von Fukui *et al.*, (2011) genutzte *gfp*, verwendet werden, oder der Promotor lediglich mit *lacZ* fusioniert werden. Eine weitere Lösung wäre die Integration des Fusionskonstruktes direkt in das Chromosom (Simons *et al.*, 1987).

Neben der C-Quelle hatte in dieser Arbeit ebenfalls der pH-Wert des Anzuchtmediums einen Einfluss auf die Aktivität des *atpIp_{Eco}* (Abb. 8 A). Die Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen in *Streptococcus pneumoniae* überein, wo die Transkription des *atp*-Operons mit sinkendem pH-Wert des Anzuchtmediums kontinuierlich steigt (Martín-Galiano *et al.*, 2001). Ebenso wurde dies in *S. mutans* und *S. sanguis* gezeigt, welche die F₁F_o-ATPase zur Aufrechterhaltung des internen pH-Wertes in saurer Umgebung nutzen und daher die Transkription bei niedrigem pH-Wert verstärken (Belli und Marquis, 1991; Bender *et al.*, 1986; Dashper und Reynolds, 1992; Kobayashi, 1985; Kobayashi *et al.*, 1986; Kuhnert *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2014). Das *atp*-Operon von *Corynebacterium glutamicum* wird hingegen bei erhöhten pH-Wert induziert, die Gründe hierfür wurden allerdings nicht untersucht (Barriuso-Iglesias *et al.*, 2006; Barriuso-Iglesias *et al.*, 2008). Möglich wäre, dass eine

erhöhte Anzahl an F_1F_o -ATPasen trotz der im Verhältnis geringer werdenden H^+ im Wachstumsmedium mit steigendem pH-Wert die ATP-Produktion aufrechterhalten soll.

Die niedrigere Aktivität von *atpIp* bei pH 8,0 widerspricht allerdings früheren Beobachtungen in *E. coli*, nach denen die Expression von $AtpI'$ -LacZ zwischen pH 5,7 und 7,5 gleich bleibt (Kasimoglu *et al.*, 1996) und die Transkriptmenge einiger Gene des *atp*-Operons in Microarrays bei pH 8,7 gegenüber pH 5,0 und 7,0 erhöht ist (Maurer *et al.*, 2005). Die Diskrepanz läßt sich möglicherweise auf die Verwendung des Vektors pRS551 zurückzuführen. Wegen der toxischen Wirkung von hohen Mengen an Laktose-Permease (Padan *et al.*, 1983) würde eine erhöhte Expression bei pH 8,0 zu zusätzlichem Zellstress führen und die Expression der β -Galaktosidase negativ beeinflussen (Abb. 8 A).

Für die Analyse des *atpIp_{Eco}* war das Plasmid pRS551 nicht geeignet (Abb. 7 A, Abb. 8 A). Aufgrund der geringen Hintergrundaktivität (Abb. 6; Simons *et al.*, 1987) ist es aber weiterhin attraktiv für Untersuchungen der Aktivität schwächerer Promotoren, wie in Kurata *et al.* (2013) gezeigt. Außerdem verhindert der Terminator des *lac*-Operons (Hediger *et al.*, 1985) auf dem Plasmid pRS551, dass ein starker Promotor die Replikation des Plasmids beeinflusst, und stabilisiert damit die Plasmidanzahl pro Zelle (Simons *et al.*, 1987).

4.2 Das *atp*-Operon von *C. metallidurans*

Die Untersuchung der *atp_{Eco}*-Promotoren lieferten keine neuen Erkenntnisse, bestätigten aber publizierte Resultate. Im Vergleich wurde das Operon von *C. metallidurans* näher untersucht, weil es einen langen intergenischen Bereich zwischen *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}* aufweist. Die RT-PCR zeigte, dass *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}* auf einer mRNA liegen. Allerdings scheint *atpI_{Cmet}* auch mit *Rmet 3502* auf einer mRNA zu liegen, obwohl dieses gemäß seiner Annotation in entgegengesetzter Richtung orientiert ist (Abb. 15). Dieses Ergebnis könnte auf einen fehlenden beziehungsweise schwachen Terminator nach *Rmet 3503* zurückzuführen sein oder auf einen langen 3' untranslatierten Bereich von *Rmet 3502*. In letzterem Fall würden AH11 und AH36 jeweils innerhalb des 3' bzw. 5' untranslatierten Bereichs binden (Abb. 16).

Die Studien zeigten, dass in dem Bereich 400 bp stromaufwärts des Startcodons vor *atpI_{Cmet}* ein Promotor liegt (Abb. 13 und Abb. 17). Der Primer AH1 bindet 229 bp vor dem *atpI_{Cmet}*-Startcodon an die DNA und damit innerhalb des Bereichs in dem sich der Promotor befindet. Das mit den Primern AH1 und AH56 in der RT-PCR erhaltene positive Signal könnte demzufolge darauf zurückzuführen sein, dass der Promotor stromaufwärts der Bindestelle von

4 Diskussion

AH1 liegt. Dies stimmt auch mit dem fehlenden Signal für die RT-PCR mit AH56 und AH11 überein, da letzterer Primer 500 bp vor dem *atpI_{Cmet}*-Startcodon bindet (Abb. 15).

Gegen diese mögliche Lage des *atpI_{Cmet}*-Promotors spricht, dass in dem intergenischen Bereich zwischen *atpI_{Cmet}* und *Rmet 3502* eine Übereinstimmung zur -10 und -35 Region des vegetativen Sigmafaktors Sigma A aus *Bacillus subtilis* (-10 Region TATAAT, -35 Region TTGACA; Haldenwang, 1995) gefunden wurde (Abb. 29). Die Regionen weisen ebenfalls starke Ähnlichkeit zu dem in *E. coli* identifizierten Promotor auf (Jones *et al.*, 1983; Porter *et al.*, 1983). Weiter stromaufwärts findet man keine ähnlich starken Übereinstimmungen (Abb. 29). Die genaue Lage des Promotors ließe sich in einem nachfolgenden Test durch den Einfluss einer Verkürzung des Bereichs vor der *atpI_{Cmet}'-lacZ*-Fusion auf die β -Galaktosidase-Aktivität eingrenzen. Möglich ist auch die Identifikation des Transkriptionsstarts mit Hilfe eines S1-Nuklease-Verdaus, wie es für *E. coli* gelang (Jones *et al.*, 1983; Porter *et al.*, 1983).

```
CGCAATATCCGGCCAGCCATCATgaaggcgtgatagcagccgttgcgcaaattcactgcaagcaatctgaaagc
    Rmet_3502
agattgactgatgtagcgattcctaatagaatcgtgcggtttgaattctggccgggctgaaaagttccggcct
    -35                -10
ggaatgaggcagggcaggtgGTGGTTCGAGACCGTCAGCAGGACCGTTCGCAAGCC
                                atpICmet
```

A

	-35-Region	Abstand	-10-Region
<i>C. metallidurans</i>	ttgact	18 bp	tagaat
<i>E. coli</i>	ttgaa	17 bp	tataat

B

Abb. 29: Der Start des *atp_{Cmet}*-Operons.

(A) In der Region stromaufwärts von *atpI_{Cmet}* gibt es Übereinstimmungen zu der -35- und -10-Region des Promotors vor dem *atp_{Eco}*-Operon. Die mögliche -10- und -35-Region sind markiert (fett, unterstrichen). Die zu *atpI_{Cmet}* und *Rmet 3502* gehörigen Sequenzbereiche sind in Großbuchstaben angegeben. (B) Eine Gegenüberstellung der möglichen -10- und -35-Region von *C. metallidurans* und *E. coli* und dem Abstand zwischen den Regionen ist tabellarisch erfasst (Jones *et al.*, 1983; Porter *et al.*, 1983).

Die Daten der RT-PCR zeigen, dass *atpI_{Cmet}* zum *atp_{Cmet}*-Operon gehört und die Promotorstudien belegen, dass ein Promotor vor *atpI_{Cmet}* existiert, der nicht mehr als 400 bp von dessen Startcodon entfernt liegt (Abb. 13 und Abb. 17). Das *atp*-Operon von *C. metallidurans* wird ebenso wie das von *E. coli* konstitutiv exprimiert (Abb. 13). Der leichte Abfall in der Aktivität bei Eintritt in die stationäre Phase deckt sich mit den Beobachtungen in

E. coli (Kasimoglu *et al.*, 1996). Anders als in *E. coli* ist die Translation von AtpI_{Cmet}'-LacZ bei pH 8,0 erhöht (Abb. 17 C; McMillan *et al.*, 2007). Der Anstieg beträgt aber weniger als 50 % und betrifft ausschließlich AtpI_{Cmet}'-LacZ, was nicht auf eine generelle pH-Abhängigkeit des *atpCmet*-Operons hindeutet. Möglich wäre aber, dass die Expression von *atpI_{Cmet}* unabhängig vom Rest des Operons reguliert ist, wie es in *C. glutamicum* gezeigt wurde (Barriuso-Iglesias *et al.*, 2006).

Trotz des langen intergenischen Bereichs zwischen *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}* scheint das *atpCmet*-Operon nicht wie in *C. glutamicum* (Barriuso-Iglesias *et al.*, 2006) sondern *E. coli* (Abb. 6-Abb. 8.; Porter *et al.*, 1983) organisiert zu sein. Der vor *atpB_{Cmet}* postulierte putative Promotor (Abb. 17) konnte nicht eindeutig bestätigt werden. Die Fusion mit *atpB_{Cmet}* zeigte keine Aktivität, unabhängig davon ob nur das Startcodon fusioniert wurde (Abb. 17 B) oder das komplette Gen ohne Stoppcodon (Daten nicht gezeigt). Eine falsche Annotation des Leserasters kann ausgeschlossen werden, da die Sequenz von *atpB* stark konserviert ist (Abb. A 7). Da in pECD1581 und pECD1582 nur das Startcodon von *atpB_{Cmet}* mit *lacZ* fusioniert wurde, konnte auch keine für die Zelle toxische Menge an AtpB synthetisiert werden (Tab. 5; Von Meyenburg *et al.*, 1985). Die geringe Translationseffizienz von AtpE3_{Cmet}'-LacZ unter Kontrolle des intergenischen Bereichs im Vergleich zu AtpE3_{Cmet}'-LacZ unter Kontrolle des *atpI_{Cmet}* zeigt aber, dass ähnlich wie in *E. coli* mindestens ein schwacher Promotor auf den starken Promotor vor *atpI* folgt (Abb. 17 B, C). Die physiologische Relevanz dieses Promotors ist ebenso wie in *E. coli* unklar. Eine pH-Abhängigkeit wie in *C. glutamicum* (Barriuso-Iglesias *et al.*, 2006) liegt nicht vor (Abb. 17 C).

4.3 Ein Vergleich von AtpI_{Cmet} und AtpI_{Eco}

AtpI_{Eco} und AtpI_{Cmet} teilen viele Gemeinsamkeiten. Dazu gehört das Vorhandensein von vier möglichen Transmembranhelices (Tab. 7, Abb. 10), die für *E. coli* bestätigt werden konnten (Abb. 18) und der Vorhersage in Walker *et al.* (1984b) ähneln. Ein Nachteil des für die Analyse verwendeten Systems wurde in Fällen dokumentiert, in denen die Fusion mit zytoplasmatischen Domänen in einer mittel-hohen Aktivität der Alkalischen-Phosphatase resultierten (Akiyama *et al.*, 1987; Boyd *et al.*, 1987; Sugiyama *et al.*, 1991).

Als alternatives Reportersystem zur Alkalischen-Phosphatase verwendeten einige Arbeitsgruppen die β -Laktamase. Sie besitzt ebenfalls eine Signalsequenz für die Sekretion in das Periplasma (Kadonaga *et al.*, 1984; Koshland und Botstein, 1982), wo das Protein Disulfidbrücken ausbildet und zum aktiven Enzym faltet (Pollitt und Zalkin, 1983). Ist es im Periplasma lokalisiert, vermittelt das Enzym Resistenz gegenüber β -Laktamen wie Ampicillin

4 Diskussion

(Spratt, 1983). Plattiert man Bakterien mit hoher Zelldichte auf Ampicillin-haltigem Agar aus, können diese allerdings auch wachsen wenn die β -Laktamase im Zytoplasma lokalisiert ist. Dies ist möglich, weil das von lysierten Zellen in die Umgebung entlassene Enzym das Antibiotikum hydrolysiert und damit inaktiviert (Broome-Smith und Spratt, 1986; Kadonaga und Knowles, 1985; Spratt, 1983). Somit kann die Synthese von Fusionsproteinen gezeigt werden, ohne einen Western Blot anzufertigen um die entsprechenden Proteine mittels Antikörper zu identifizieren. Ein Vorteil in der Verwendung der β -Laktamase als Reportergen besteht darin, dass es als Monomer aktiv ist und nicht als Dimer wie die Alkalische-Phosphatase (Tadayyon *et al.*, 1992).

In dieser Arbeit wurde die β -Laktamase mit und ohne Signalsequenz als Kontrolle für die Aktivitäten von LacZ- und PhoA-Fusionsproteinen im Zytoplasma und Periplasma verwendet (Abb. 18). Diese Kombination eignet sich, um die mit Hilfe der Alkalischen-Phosphatase gewonnenen Daten zu bestätigen, da die Aktivitäten ein komplementäres Bild geben (Manoil, 1990). Im Gegensatz zur Alkalischen-Phosphatase ist die β -Galaktosidase als Tetramer (Zipser, 1963) im Zytoplasma aktiv (Froshauer *et al.*, 1988; Oliver und Beckwith, 1981). Die Fusionierung von LacZ mit einigen Membranproteinen ist aber problematisch, da die Fusionsproteine nicht vollständig transportiert werden (Bassford *et al.*, 1979; Emr und Silhavy, 1980). Es wird vermutet, dass die Faltung von LacZ die Sekretion inhibiert (Oliver und Beckwith, 1981; Snyder und Silhavy, 1995). Werden zu viele Fusionsproteine synthetisiert, blockieren sie den Transportweg. Die anschließende Akkumulierung von unvollständig gefalteten Proteinen führt zum Zelltod (Freudl *et al.*, 1988; Silhavy *et al.*, 1977; Tommassen *et al.*, 1985).

Im Gegensatz zu AtpI_{Eco} besitzt AtpI_{Cmet} einen hohen Anteil an geladenen AS am N-Terminus (Abb. 11). Die Existenz dieser Region konnte hier bestätigt werden (Abb. 12), wobei Aktivitätsstudien zeigten, dass die Stabilität der Fusionsproteine mit dem Anteil an AtpI_{Cmet} steigt (Abb. 13 B). Für die AtpI_{Eco}-Fusionen wurde dies nicht beobachtet (Abb. 9).

Die Topologievorhersage für AtpI_{Cmet} (Abb. 10 B) experimentell zu bestätigen war nicht möglich, da die C-terminalen Fusionen der verkürzten Varianten von *atpI_{Cmet}* mit '*lacZ* und '*phoA* in *E. coli* nicht exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass *E. coli* die RBS von *atpI_{Cmet}* nicht erkennt. Dass translationale Fusionen von *atpI_{Cmet}* mit *lacZ* in *C. metallidurans* exprimiert werden, wurde in dieser Arbeit über eine SDS-PAGE gezeigt (Abb. 12) und die Aktivität der β -Galaktosidase wurde ebenfalls bestätigt (Abb. 13).

Um die Zahl der Transmembranhelices von AtpI_{Cmet} zu untersuchen, könnte man die Experimente in *C. metallidurans* mit anderen Reportern wiederholen oder eine andere RBS verwenden. In neueren Studien wurde GFP anstelle von LacZ für die Untersuchung der Topologie genutzt (Drew *et al.*, 2002; Gandlur *et al.*, 2004). Die Verwendung von GFP ist attraktiv, da es gegenüber LacZ wesentlich kleiner ist (Chalfie, 1995). Fusioniert mit einem Membranprotein, dass mit dem Sec vermittelten Transport in die Membran integriert wird, ist GFP nur im Zytoplasma aktiv (Feilmeier *et al.*, 2000). Mit dem von Jeong *et al.* (2004) entwickelten Fluoreszenz-Reportersystem ließe sich auch die Lokalisation im Periplasma nachweisen. Dabei wird das Fragment eines Antikörpers (scFv) mit dem zu untersuchenden Protein fusioniert. Das Peptid bindet mit hoher Affinität an ein fluoreszierendes Hepten-Konjugat, dass durch die permeabilisierte äußere Membran dringt, aber nicht durch die innere. Die oxidierende Umgebung des Periplasmas ermöglicht die Ausbildung von Disulfidbrücken und damit die korrekte Faltung des scFv Peptids und verhindert somit falsch positive Signale (Islam und Lam, 2013; Jeong *et al.*, 2004).

4.4 Die Lokalisierung von AtpI_{Eco} in der Membran

Die Lokalisierung des C-Terminus von AtpI_{Eco} im Periplasma wurde unabhängig von den Membran-Topologie-Studien auch über eine Fusion mit eGFP gezeigt (Abb. 19 D, I, M). Da eGFP in der oxidierenden Umgebung des Periplasmas fehlfaltet, erlangt es nur im Zytoplasma eine aktive Konformation (Feilmeier *et al.*, 2000). Unter allen getesteten Bedingungen war eine gleichmäßige Verteilung des Fusionsproteins in der Membran erkennbar. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Fusion mit eGFP die Dimerbildung und/ oder die Bindung an die F_1F_0 -ATPase verhindert und dies zu einem veränderten Verhalten in der Membran führt.

Zur Verteilung der F_1F_0 -ATPase in der Membran gibt es verschiedene Studien. Lai *et al.* (2004) identifizierten eine Assoziation von AtpB_{Eco} und AtpA_{Eco} mit der Membran von Minizellen und postulierten eine Anreicherung dieser Proteine an den Zellpolen. Dies könnte die beobachtete Anreicherung von AtpI_{Eco} an den Zellpolen in dieser Arbeit erklären (Abb. 19 D, L), da AtpI_{Eco} mit der F_1F_0 -ATPase interagiert (Abb. 20 und Abb. A 3, Abb. 25; Bahr, 2014; Bley, 2014; Passian, 2014). Die lokale Konzentration könnte auch mit einer gegenüber AtpI_{Eco} erhöhten Konzentration des Fusionsproteins erklärt werden. Der Fusionspartner *egfp* könnte die mRNA und/ oder das synthetisierte Protein stabilisieren. Wegen dieser Eigenschaft wurde ein GFP-Derivat schon als Protein-*tag* für die Reinigung der TEV Protease verwendet (Wu *et al.*, 2009). Zu bedenken ist auch, dass die Fusion zwar unter Kontrolle des natürlichen

4 Diskussion

Promotors vom Chromosom exprimiert wird, $atpI_{Eco}$ in dem Stamm aber nicht deletiert ist (Tab. 1). Die Synthese erhöhter Mengen an $AtpI_{Eco}$ ist daher eine mögliche Ursache für die lokale Akkumulation.

Ausgenommen der gerade diskutierten Ausnahmen ist $AtpI$ -eGFP-AtpI unabhängig vom Anzuchtmedium gleichmäßig über die Membran verteilt (Abb. 19). Dies steht in Einklang mit früheren Studien, die eine gleichmäßige Verteilung der F_1F_0 -ATPase über die Membran zeigten (Li und Young, 2012). Neuere Beobachtungen sprechen von einer heterogenen Verteilung des Enzyms mit lokalen Konzentrationen und einer hohen Mobilität innerhalb der Membran (Erhardt *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2004; Llorente-Garcia *et al.*, 2014).

Bei $AtpI$ könnte es sich um ein strukturelles Bindeglied zur Formung eines Superkomplexes handeln, welcher aus Komponenten der Atmungskette besteht. In Eukaryoten gibt es Hinweise auf die Existenz von Superkomplexen, die dazu dienen die oxidative Phosphorylierung zu optimieren (Acín-Pérez *et al.*, 2008; Lapuente-Brun *et al.*, 2013; Schägger und Pfeiffer, 2000). In einigen Bakterien wurden Superkomplexe aus Komplex III und IV isoliert. Dazu gehören *Paracoccus denitrificans* (Berry und Trumpower, 1985), das thermophile Bakterium PS3 (Sone *et al.*, 1987) und das thermoacidophile Archaeon *Sulfolobus* sp. Stamm 7 (Iwasaki *et al.*, 1995a; Iwasaki *et al.*, 1995b). Auch aus *B. subtilis* und *E. coli* wurden Superkomplexe isoliert (García Montes de Oca *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2013a; Sousa *et al.*, 2013b). In Bakterien könnten Superkomplexe zum Beispiel bei hohem äußerem pH-Wert die Bildung und optimale Nutzung eines Protonengradienten fördern. alkaliphile *Bacillus*-Spezies, die in Umgebungen mit pH 10,0 leben, könnten den für die Synthese von ATP durch H^+ -abhängige F_1F_0 -ATPasen benötigten Protonengradienten durch die Bildung von Superkomplexen gewährleisten - nachgewiesen wurden sie bisher aber nicht (Krulwich *et al.*, 1998).

In *B. subtilis* wurde die Lokalisierung der F_1F_0 -ATPase sowie der Succinat-Dehydrogenase untersucht und nur eine teilweise Überlappung ihrer Verteilung in der Membran verzeichnet (Johnson *et al.*, 2004), was weder ein Argument für noch gegen die Theorie der Superkomplexbildung mit diesen Enzymen liefert. Eine unregelmäßige Zusammensetzung der Superkomplexe könnte die Ergebnisse genauso erklären wie eine zufällige Ko-Lokalisation. Eine spätere Veröffentlichung zeigt, dass die F_1F_0 -ATPase vorwiegend als Monomer vorliegt, aber möglicherweise auch eingebunden in einen Superkomplex (García Montes de Oca *et al.*, 2012). Llorente-Garcia *et al.*, (2014) gehen hingegen von einer zufälligen Überlappung bei

der Verteilung von Komponenten der oxidativen Phosphorylierung aus. Bisher wurde noch nicht untersucht, wie sich veränderte Umweltbedingungen auf die Verteilung der F_1F_0 -ATPase und Komponenten der oxidativen Phosphorylierung auswirken (Magalon und Alberge, 2016). Am Beispiel der Nitratreduktase von *E. coli* konnte schon gezeigt werden, dass die Lokalisierung innerhalb der Membran von äußeren Einflüssen abhängen kann (Alberge *et al.*, 2015).

Um eine Ko-Lokalisation der F_1F_0 -ATPase mit $AtpI_{Eco}$ nachzuweisen, wurde zusätzlich zu $AtpI_{Eco}$ auch $AtpB_{Eco}$, ein fester Bestandteil des Enzyms (Fillingame und Steed, 2014), mit einem Fluorophor fusioniert. Als Reporter wurde mCherry gewählt, weil das rot fluoreszierende mRFP1 (*monomeric red fluorescent protein*), das von dem rot fluoreszierenden Protein von *Discosoma* sp. (DsRed) abstammt (Campbell *et al.*, 2002), auch im Periplasma aktiv ist (Chen *et al.*, 2005). Bei mCherry handelt es sich um ein Derivat von mRFP1 (Shu *et al.*, 2006). Zudem wird $AtpB_{Eco}$ mit Hilfe des Sec-Weges in die Membran integriert und Aronson *et al.* (2011) konnten zeigen, dass mCherry unter diesen Bedingungen aktiv ist. Ein Nachweis der Ko-Lokalisation der F_1F_0 -ATPase mit $AtpI_{Eco}$ schlug fehl, da nach der Integration von *atpB'*-*mcherry* in das Chromosom kein Fluoreszenzsignal detektierbar war (Daten nicht gezeigt). Vor der Integration war *AtpB'*-mCherry nur im Zytoplasma lokalisiert (Abb. A 2), was darauf hinweist, dass die mCherry-Fusion nicht in die Membran integriert wurde. Die Fusion eines Fluorophors mit dem C-Terminus von $AtpB_{Eco}$ war in anderen Studien funktional, sie benutzten allerdings ein GFP-Derivat als Reporterprotein (Erhardt *et al.*, 2014; Düser *et al.*, 2008; Llorente-Garcia *et al.*, 2014). In zukünftigen Experimenten könnte man $AtpB_{Eco}$ mit einem anderen Reporter fusionieren.

4.5 $AtpI_{Eco}$ interagiert mit Untereinheiten der F_1F_0 -ATPase

Der BACTH-Assay eignet sich um Protein-Protein-Interaktionsstudien *in vivo* durchzuführen. Die Methode hat aber auch Nachteile. Zum einen muss das Ausbleiben einer Interaktion im BACTH-Assay nicht bedeuten, dass die untersuchten Proteine tatsächlich nicht miteinander interagieren. Das T18- oder T25-Fragment könnte eine Interaktion stören oder verhindern. Um die Anzahl falsch negativer Interaktionen zu minimieren, werden daher beide Fragmente jeweils mit dem N- und C-Terminus der Zielproteine fusioniert und die Interaktion mit allen möglichen Kombinationen getestet (Battesti und Bouveret, 2012; Weaver *et al.*, 2013). Zum anderen ist der BACTH-Assay anfällig für falsch positive Signale. Sie können entstehen, wenn sich die untersuchten Proteine in räumlicher Nähe befinden ohne direkt miteinander zu

interagieren (Huynh *et al.*, 2015). Vor allem bei Membranproteinen beobachtete man schwach positive Signale, die auf eine gedrängte Lokalisierung innerhalb der Membran zurückgeführt werden (Battesti und Bouveret, 2012). Daher wurden neben den optischen Ergebnissen auch die β -Galaktosidase-Aktivitäten bestimmt. Die Höhe der Aktivität kann Aufschluss darüber geben, wie stark die Interaktion der Zielproteine ist. Zur Kontrolle wurde die Interaktion von CynS mit sich selbst herangezogen. Es bildet ein Homodecamer (Anderson, 1980; Walsh *et al.*, 2000) und zeigte ähnlich wie das in anderen Arbeiten verwendete Kontrollprotein Zip eine hohe β -Galaktosidase-Aktivität (Abb. 20; Graf *et al.*, 2014; Witan *et al.*, 2012). Für die Interaktion von AtpI_{Eco} mit sich selbst wurden ebenfalls hohe Werte ermittelt (Abb. 20), was auf eine Multimer-Bildung schließen lässt. Das Ergebnis steht in Einklang mit der schon zuvor *in vitro* beobachteten Dimer-Bildung von AtpI aus *P. modestum* (Suzuki *et al.*, 2007).

Um die im BACTH-Assay identifizierten möglichen Interaktionen zu bestätigen, wurden nach dem Beispiel von Karimova *et al.* (2001) und Weaver *et al.* (2013) einzelne AS innerhalb von AtpI_{Eco} ausgetauscht und die Experimente wiederholt. Je nach physikalischen, chemischen und strukturellen Eigenschaften einer Aminosäure, kann ein Austausch Einfluss auf die Stabilität, Faltung und Funktion eines Proteins haben (Betts und Russell, 2003). Da für AtpI_{Eco} bisher keine Funktion bekannt ist, war es nicht möglich die Wirkung einer AS-Substitution auf die Funktionalität zu prüfen. Mit Ausnahme des Austausches von Serin an Position 39 gegen Leucin konnte die Synthese und Membranintegration aller AtpI_{Eco} Varianten in *E. coli* nachgewiesen werden (Abb. 22, Abb. 23; Passian, 2014). Bei Serin handelt es sich um eine kleine Aminosäure, die bei Lokalisierung in Helices oft an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Sauerstoff einer Carbonylgruppe der vorhergehenden Windung beteiligt ist (Gray und Matthews, 1984). Die größere AS Leucin an der gleichen Position könnte die Proteinstruktur destabilisiert haben und den beobachteten Abbau des Proteins erklären, während das ebenfalls kleine Glycin (Betts und Russell, 2003) an dieser Position eine negative Wirkung auf die Protein-Protein-Interaktionen hatte (Abb. 24, Tab. 9).

Insgesamt zeigten alle AS-Austausche einen Effekt. Glycin lässt sich aufgrund seiner Größe und Struktur meist nicht austauschen ohne die Faltung des Proteins zu beeinflussen (Betts und Russell, 2003). In α -Helices ist Glycin oft zu Helix-Helix-Berührungsflächen orientiert und an der Dimerbildung bzw. der Interaktion von Helices beteiligt (Javadpour *et al.*, 1999). In einer Gewebe-unspezifischen Alkalischen Phosphatase aus Menschen (TNSALP) führt die Substitution eines Glycins zu dem Unvermögen ein Dimer zu bilden und löst damit die

erbliche Störung Hypophosphatasie aus (Makita *et al.*, 2012). Auch G43 von AtpI_{Eco} spielt für die Dimerbildung und damit die Interaktion mit anderen Proteinen eine entscheidende Rolle (Abb. 24, Tab. 9).

Von den wenigen geladenen AS die AtpI_{Eco} beinhaltet, liegen zwei konservierte nah beieinander innerhalb der vorhergesagten Transmembranhelix 3 (Abb. 21). Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um Glutaminsäure an Position 79 und Lysin an Position 82. Lysin übt eine wichtige Funktion im Erhalt oder Aufbau von Proteinstrukturen aus (Sinha *et al.*, 2012), kann aber auch Einfluss auf die Funktion des Proteins haben. Als Teil des Walker A Motivs, das ursprünglich von Walker *et al.* in der AtpA und AtpD Untereinheit der F₁F_o-ATPase entdeckt wurde (Saraste *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1982), spielt Lysin eine Rolle bei der ATP-Bindung bzw. dessen Positionierung innerhalb der Bindetasche (Frelet und Klein, 2006; Schneider und Hunke, 1998). Innerhalb der Sequenz von AtpI_{Eco} konnte kein Walker A Motiv identifiziert werden (Abb. 21). Die Anwesenheit von Lysin scheint aber für die Protein-Protein-Interaktion eine sehr wichtige Rolle zu spielen, da der Phänotyp nach dem Austausch an Position 82 durch das Einfügen eines Lysins an Position 79 zum Teil aufgehoben werden kann (Abb. 24, Tab. 9).

Glutamat hat einen großen Einfluss auf Proteinstrukturen, wie am Beispiel der DNA-Bindetasche von HapR aus *Vibrio cholerae* (Singh *et al.*, 2013) und der Dimerbildung der Flavin Reduktase FRP aus *Vibrio harveyi* (Jawanda *et al.*, 2008) gezeigt werden konnte. Auch die Substitution von Glutamat 79 in AtpI_{Eco} hatte einen negativen Effekt auf die Protein-Protein-Interaktionen (Abb. 24, Tab. 9).

Warum der Austausch von Valin an Position 88 gegen Glycin einen positiven Einfluss auf die Interaktion von AtpI_{Eco} mit anderen Proteinen hatte, muss durch weitere Experimente geklärt werden. Glycin spielt eine einzigartige Rolle in der Struktur von Proteinen (Betts und Russell, 2003) und könnte andere Aminosäuren im Hinblick auf die Interaktion mit anderen Proteinen besser positioniert haben. Dabei kann es sich um E79 und K82 handeln, da sie nicht weit von V88 entfernt liegen (Abb. 21).

4.5.1 Das Verhältnis von AtpI_{Eco} zur F₁F_o-ATPase

Die Ergebnisse des BACTH-Assays zeigten, dass nicht nur AtpI aus *P. modestum*, sondern auch aus *E. coli* ein Multimer bildet (Abb. 20; Suzuki *et al.*, 2007) und möglicherweise auch nur als Multimer mit anderen Proteinen interagiert. Für letzteres spricht, dass Mutationen, welche die Multimer-Bildung von AtpI_{Eco} beeinflussen, einen negativen Effekt auf die

4 Diskussion

Interaktion mit Untereinheiten der F_1F_0 -ATPase hatten (Abb. 24; Tab. 9). Für die Stöchiometrie von AtpI zur F_1F_0 -ATPase bedeutet dies, dass nach den bisher ermittelten Werten weniger AtpI-Dimere pro Zelle synthetisiert werden als F_1F_0 -ATPasen (Brusilow *et al.*, 1983; Solomon *et al.*, 1989). Dies wiederum spricht dafür, dass AtpI entweder zur gleichen Zeit mit mehreren Enzymkomplexen interagiert oder, dass diese Interaktion nur temporär ist.

Bisher gibt es keine eindeutigen Daten zum Verhältnis von AtpI zur F_1F_0 -ATPase. Die translationale Fusion von *atpI_{Eco}*, *atpB_{Eco}* und *atpE_{Eco}* hat wie erwartet gezeigt, dass die Stöchiometrie der F_1F_0 -ATPase-Untereinheiten auf Ebene der Translation reguliert wird (Abb. 9; Angov und Brusilow, 1988; McCarthy *et al.*, 1985; McCarthy und Bokelmann, 1988). Die Aktivität von AtpI15_{Eco}'-LacZ, AtpI372_{Eco}'-LacZ und AtpB15_{Eco}'-LacZ war etwa gleich, was auf ein Verhältnis von 1:1 deutet. Die ähnliche Translationseffizienz korreliert mit den Daten aus der Literatur. Die mRNA-Stabilität von *atpI_{Eco}* und *atpB_{Eco}* ist geringer als die der anderen Gene im *atp_{Eco}*-Operon (Schramm *et al.*, 1996), was im Fall von *atpB_{Eco}* zur Gewährleistung der Stöchiometrie im aktiven Enzym beiträgt (Foster und Fillingame, 1982) und gleichzeitig die Überproduktion eines sonst toxischen Proteins verhindert (Von Meyenburg *et al.*, 1985). Das Verhältnis von AtpI_{Eco}'-LacZ zu AtpB_{Eco}'-LacZ entspricht den Beobachtungen von Brusilow *et al.* (1983).

Suzuki *et al.* konnten die Bildung von AtpI-Dimeren von *P. modestum* identifizieren und in dieser Arbeiten zeigten BACTH-Studien, dass auch AtpI von *E. coli* Dimere formt (Abb. 20 und Abb. A 3; Suzuki *et al.*, 2007). Bisher ist noch nicht bekannt, ob AtpI als Dimer oder Monomer mit der F_1F_0 -ATPase interagiert. Nach der Theorie, dass AtpI eine Chaperon-ähnliche Funktion bei der Zusammensetzung des AtpE-Rings ausübt (Brandt *et al.*, 2013b; Ozaki *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2007), würde es genügen wenn weniger als ein AtpI_{1/2} pro F_1F_0 -ATPase vorhanden ist. Dies gilt jedoch nur, wenn AtpI wie in *E. coli* nicht fester Bestandteil des Enzyms ist (Brusilow *et al.*, 1981; Foster *et al.*, 1980). In *B. pseudofirmus* OF4 scheint das Fehlen von AtpI die Stabilität der F_1F_0 -ATPase zu beeinflussen (Liu *et al.*, 2013). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass AtpI eine entscheidende Funktion bei der Zusammensetzung der ATPase spielt oder doch permanenter Bestandteil ist. In letzterem Fall würde AtpI bei einem Verhältnis von 1:1 zur F_1F_0 -ATPase als Monomer mit dem Enzym interagieren. Ein AtpI-Dimer könnte zwei F_1F_0 -ATPasen miteinander verbinden.

4 Diskussion

In Mitochondrien liegen die F_1F_0 -ATPasen als Dimere vor und beeinflussen die Form der Cristea. An der Bindung sind aber verschiedene Proteine beteiligt, die keine Entsprechung in Bakterien haben (Davies *et al.*, 2012; Hahn *et al.*, 2016). Es gibt auch keine Hinweise dafür, dass die Membran von Bakterien die gleiche Faltung aufweist, wie die innere Membran von Mitochondrien (Delgado *et al.*, 2015; Davies *et al.*, 2012).

Solomon *et al.* (1989) postulierten ein wesentlich geringeres Verhältnis von AtpI zu AtpB. Für ihre Studien fusionierten sie 248 Basen von *atpI_{Eco}* mit *lacZ*. Diese Fusion endet mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb der Transmembrandomäne 3 (Tab. 7), was die geringe Aktivität erklären könnte. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse sprechen trotzdem nicht unbedingt gegen ein geringeres Verhältnis. In *E. coli* setzt sich der F_0 -Teil neben zwei AtpF aus einem AtpB und einem AtpE-Ring, bestehend aus 10 Monomeren, zusammen (Ballhausen *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2001). Nach den hier berechneten Aktivitäten für AtpB15_{Eco}'-LacZ und AtpE15_{Eco}'-LacZ beträgt das Verhältnis beider Fusionsproteine 1:49 statt 1:10 (Abb. 9). In dieser Arbeit wurden nur die ersten 15 Basen von *atpB_{Eco}* und *atpE_{Eco}* mit *lacZ* fusioniert (Tab. 5). In der Literatur führte eine Fusion von 60, 92 oder 126 Basen von *atpB_{Eco}* mit *lacZ* mit steigender Genlänge zu einer höheren Aktivität. Diese sank etwa um das 10-fache wenn 704 Basen von *atpB_{Eco}* mit *lacZ* fusioniert waren (Solomon *et al.*, 1989). Die Differenz ließ sich zum Teil aufheben, wenn eine innerhalb der kodierenden Sequenz von *atpB_{Eco}* liegende RBS mutiert war (Matten *et al.*, 1998). Die hier bestimmten Aktivitäten für AtpB15_{Eco}'-LacZ müssen demnach nicht mit der Menge an synthetisiertem AtpB_{Eco} korrelieren.

Die zunehmende Länge des N-Terminus von AtpI_{Cmet} führte ebenfalls zu einer Steigerung der Aktivität von AtpI_{Cmet}'-LacZ (Abb. 13), vielleicht durch eine erhöhte Stabilität des Fusionsproteins oder der mRNA. Für *atpI_{Eco}*'-LacZ hatte die Länge der *atpI_{Eco}*-Sequenz keine Auswirkungen auf die Höhe der β -Galaktosidase-Aktivität, trotz der innerhalb von *atpI_{Eco}* lokalisierten Stamm-Schleifen-Strukturen und RNase E-Schnittstellen (Abb. 9). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die bis auf das Stoppcodon mit einem Reporter fusionierten Gene *atpI*, *atpB* und *atpE* in einer anderen Aktivität resultieren. Dies gilt sowohl für die Gene aus *E. coli* als auch die aus *C. metallidurans*. Daher ist es nicht möglich mit den hier erhobenen Daten ein Verhältnis von AtpI zur F_1F_0 -ATPase zu berechnen.

Gerstel und McCarthy (1989) sahen keinen Unterschied in der Aktivität von chromosomalen Integrationen und der Expression vom Plasmid, daher wurden die Konstrukte in dieser Arbeit

4 Diskussion

nicht ins Chromosom integriert. Sie testeten allerdings keine *atpI*-Fusion, sondern die Aktivität von translationalen Fusionen von *atpB*, *atpH*, *atpA* und *atpG* mit *lacZ*. Weiterhin stellten sie fest, dass eine Manipulation der Translation-Initiationsregion von *atpG* größere Effekte zeigt, wenn das Konstrukt ins Chromosom integriert ist. Es ist also nicht auszuschließen, dass die Expression der *atpI*-, *atpB*- und *atpE*-Fusionen vom Chromosom in einem anderen Verhältnis resultieren würde.

Es ist wiederum zu bedenken, dass starke Promotoren die Plasmid-Replikation beeinflussen können (Gentz *et al.*, 1981). In den pECD1555 und pECD1556 Derivaten sind die Promotoren so angeordnet, dass sie hinter dem Replikationsursprung liegen, aber in der gleichen Orientierung (Kovach *et al.*, 1995; Tab. 5). Da die Promotoren innerhalb von *atpI_{Eco}* keine Rolle spielen (Abb. 6), stünde der Replikationsursprung aber in jedem der hier verwendeten Plasmide unter dem zusätzlichen Einfluss des gleichen Promotors.

Um gesichertere Ergebnisse für das Verhältnis von AtpI zur F₁F_o-ATPase zu erhalten, sollte eine Integration der Konstrukte ins Chromosom erfolgen. Damit wäre die Transkription von einem einzelnen Gen pro Zelle möglich und etwaige Regulatoren wären somit im korrekten Verhältnis vorhanden. Ein weiterer Vorteil bestünde in der Umgehung eines Antibiotika-Selektionsdruckes zur Aufrechterhaltung von Plasmiden (Sieben *et al.*, 2016).

Reporterfusionen zur Bestimmung des Proteinverhältnisses bedürfen geeigneter Reporter Gene. Dafür sind weder *lacZ* noch *gfp+* geeignet, die bei C-terminaler Fusion mit AtpI, AtpB und AtpE zum Teil in das Periplasma ragen (vergl. Tab. 8), und dort aufgrund der oxidativen Umgebung inaktiv sind (Feilmeier *et al.*, 2000; Froshauer *et al.*, 1988). Eine gute Lösung stellt das GFP-Derivat sfGFP dar, das auch im Periplasma funktional ist (Aronson *et al.*, 2011; Dammeyer und Tinnefeld, 2012; Dinh und Bernhardt, 2011; Pédelacq *et al.*, 2006). Man müsste aber testen, ob seine Fluoreszenz in Zyto- und Periplasma gleich ist.

Ebenfalls möglich ist die Bestimmung des Verhältnisses mit Hilfe von Antikörpern, wofür AtpI_{Eco}, AtpB_{Eco} und AtpE_{Eco} mit einem kurzen Protein-*tag* (z. B. His-*tag*) versehen und unter Kontrolle des *atpI_{Eco}* vom Chromosom exprimiert werden könnten. Damit wäre eine Expression auf physiologisch korrektem Level gewährleistet und ein negativer Einfluss von Fusionsproteinen, wie ihn Winteler *et al.* (1996) für LacZ beobachteten, ausgeschlossen.

Bei diesem Ansatz ist eine Expression vom Chromosom unter natürlichen Bedingungen unabdingbar, da eine verstärkte Expression von *atpB_{Eco}* toxisch wirkt (Von Meyenburg *et al.*, 1985). Die unterschiedlichen Molekulargewichte von AtpI_{Eco}, AtpB_{Eco} und AtpE_{Eco}

ermöglichen eine leichte Unterscheidung über eine SDS-PAGE. Mit der Verwendung eines Antikörpers für alle Proteine, lässt sich ihr Verhältnis nach der Detektion bestimmen. Zu berücksichtigen ist, dass viele Tags, wie auch der His-tag (Majorek *et al.*, 2014; Panek *et al.*, 2013), die Eigenschaften eines Fusionsproteins maßgeblich beeinflussen können.

4.5.2 AtpI_{Eco} interagiert mit Komponenten des F_o-Komplexes

Obwohl N- und C-Terminus von AtpE_{Eco} im Periplasma lokalisiert sind, zeigte der BACTH-Assay positive Signale (Abb. 24, Tab. 9). Dies lässt vermuten, dass AtpI_{Eco} und AtpE_{Eco} schon im Zytoplasma mit schwacher Affinität interagieren. Diese Vermutung wird durch die von Sebastian Bley gezeigte Membranintegration der Fusionsproteine T25'-AtpI_{Eco} und AtpE_{Eco}'-T18 nicht ausgeschlossen (Bley, 2014).

Ob die Proteine im Zytoplasma oder erst in der Membran miteinander interagieren, muss mit weiterführenden Experimenten untersucht werden. Beide Szenarien stützen die Hypothese, dass AtpI eine Rolle beim Zusammenbau des AtpE-Rings sowie dessen Integration in die Membran spielt (Brandt *et al.*, 2013b; Ozaki *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2007). Dies wird auch durch Beobachtungen von Matthies *et al.* (2011) untermauert. Das *in vitro* exprimierte *atp*-Operon von *Caldalkalibacillus thermarum* TA2.A1, bestehend aus *atpIBEFHAGDC*, resultiert auch in Abwesenheit von YidC oder der Sec-Translokase im Zusammenbau von funktioneller F₁F_o-ATPase und der Integration in Liposomen. Das Fehlen von AtpI hatte allerdings einen negativen Einfluss auf die Menge an zusammengesetzten AtpE-Ringen.

Eine mögliche Rolle von AtpI beim Zusammenbau der F₁F_o-ATPase, wird auch durch Experimente in Pflanzen gestützt. Bei einer genaueren Untersuchung des in Pflanzen konservierten Proteins AtCGL160 aus Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* stellte man eine Ähnlichkeit des C-Terminus zu AtpI von Prokaryoten fest. AtCGL160 wird in Chloroplasten für den Einbau von AtpE in die F₁F_o-ATPase benötigt. Es konnte sowohl die Interaktion von AtCGL160 mit den Untereinheiten AtpF und AtpE aus *A. thaliana* nachgewiesen werden, als auch die eines Hybridproteins bestehend aus AtpI von *Synechocystis* sp. PCC6803 kombiniert mit dem N-Terminus von AtCGL160 (Rühle *et al.*, 2014).

Eine Deletion von *atcgl160* führt zu einer generellen Abnahme der F₁F_o-ATPase in der Membran, während die Deletion von *atpI* in *E. coli* kaum einen Effekt zeigt (Abb. 26; Gay, 1984; Jensen und Michelsen, 1992). Rühle *et al.* (2014) erklären den Unterschied damit, dass der N-Terminus von AtCGL160 eine zusätzliche Funktion hat oder dass die Proteine zwar die

4 Diskussion

gleiche Funktion haben, der Zusammenbau an sich aber unterschiedlich abläuft. Anhand der nur moderaten Sequenzähnlichkeit von AtGCL160 mit AtpI einiger Prokaryoten (Rühle *et al.*, 2014) und der großen Unterschiede innerhalb der Prokaryoten (Koumandou und Kossida, 2014) ist es denkbar, dass die Rolle bei der Zusammensetzung des AtpE-Rings nur in einigen Spezies im Vordergrund steht. In anderen Organismen könnte zwar eine Interaktion mit dem AtpE-Ring erfolgen, die eigentliche Funktion von AtpI aber eine andere sein. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Liu *et al.* (2013), die in *Bacillus pseudofirmus* OF4 die Beziehung von AtpI zur F₁F₀-ATPase untersuchten. Eine Deletion von *atpI* in *B. pseudofirmus* OF4 führte zu einer Destabilisierung des Rotors und einer geringeren Assoziation des F₁-Komplexes mit der Membran, während der AtpE-Ring im zusammengebauten Enzym eine normale Größe aufwies.

Die Untersuchung der Interaktion von AtpI_{Eco} mit AtpF_{Eco} hat gezeigt, dass ein optisch positives Signal auf X-Gal-haltigem LB-Agar keine Rückschlüsse auf die Höhe der Aktivität im β -Galaktosidase-Assay erlaubt. Gemäß dieses optischen Ergebnisses sieht es aus als würden AtpI_{Eco} und AtpF_{Eco} miteinander interagieren (Tab. 9, Abb. A 3). Die Ergebnisse des β -Galaktosidase-Assay sprechen mit der sehr niedrigen Aktivität auf dem Niveau der Negativkontrolle jedoch dagegen (Abb. 20). Da AtpI_{Eco} mit AtpE_{Eco} interagiert (Bley, 2014), könnte die räumliche Nähe dieser zu AtpF_{Eco} in der Membran zu falsch positiven Ergebnissen geführt haben.

Die räumliche Nähe von AtpE zu AtpB im zusammengesetzten Enzym (Allegretti *et al.*, 2015; Hahn *et al.*, 2016; Morales-Rios *et al.*, 2015) macht es ebenfalls erforderlich die hier beschriebenen BACTH-Assay-Ergebnisse einer Interaktion von AtpI_{Eco} mit AtpB_{Eco} (Abb. 24, Tab. 9) in weiteren Experimenten nachzuweisen. Die Schwierigkeit besteht hierbei darin, dass eine erhöhte Synthese von AtpB_{Eco} zu dem partiellen Verlust des Membranpotentials durch unkontrollierten Protonenfluss (Von Meyenburg *et al.*, 1985) und zur Inhibierung des Wachstums führt (Eya *et al.*, 1989). Hinzu kommt, dass die *atpB_{Eco}* mRNA bei erhöhter Expression instabil ist (Arechaga *et al.*, 2003). Als Alternative kann man Förster *Resonance Energy Transfer* (FRET) anwenden (Bajar *et al.*, 2016). Mit Hilfe dieser Methode konnte unter anderem die Position von AtpB relativ zu AtpG und AtpC innerhalb der F₁F₀-ATPase bestimmt werden (Düser *et al.*, 2008). In anderen Experimenten wurden GFP und mCherry als geeignetes FRET-Paar beschrieben (Bajar *et al.*, 2016). Das in dieser Arbeit erstellte Fusionsprotein AtpB_{Eco}'-mCherry integrierte jedoch nicht in die Membran (Abb. A 2),

weshalb die Methode nicht angewendet werden konnte. Für zukünftige Experimente wäre demnach die Fusion von AtpB_{Eco} mit einem anderen Fluorophor nötig um FRET-Experimente durchzuführen.

In der Vergangenheit wurden *Cross-Link* Experimente erfolgreich angewandt, um Interaktionen zwischen den Untereinheiten der F_1F_0 -ATPase und eine Reihenfolge während des Zusammenbaus des Enzyms zu untersuchen. Die Ausbildung von Disulfidbrücken während des *Cross-Links* mit Kupfer-1,10-phananthrolin wurde durch Substitution einiger AS gegen Cystein unterstützt (Hilbers *et al.*, 2013). Eine Erweiterung dieser Experimente um AtpI mit entsprechenden Mutationen könnte die Ergebnisse des BACTH-Assays verifizieren und zeigen, ob AtpI eine besondere Rolle während des Zusammenbaus der F_1F_0 -ATPase in *E. coli* spielt.

4.5.3 Die Bedeutung der Interaktion von AtpI_{Eco} mit AtpC_{Eco}

Wird der F_1 - vom F_0 -Teil der ATPase getrennt, ist passiver, entkoppelter Protonen-Transport möglich (Valiyaveetil und Fillingame, 1997). Bisher ist unbekannt ob und wenn ja welche Strategien entwickelt wurden, um während des Zusammenbaus der F_1F_0 -ATPase unerwünschten Protonen-Transport zu unterbinden. In *E. coli* setzt sich der F_1 -Komplex zunächst unabhängig vom F_0 -Teil im Zytoplasma zusammen (Hilbers *et al.*, 2013). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass die Anwesenheit von AtpC die ATPase-Aktivität des F_1 -Komplexes inhibiert beziehungsweise verzögert (Laget und Smith, 1979; Kato *et al.*, 1997) und daher möglicherweise auch *in vivo* eine unkontrollierte ATPase-Aktivität während des Zusammenbaus unterbindet. Über die Interaktion mit AtpE (Bley, 2014; Suzuki *et al.*, 2007) könnte AtpI eine ähnliche Funktion während des Zusammenbaus des F_0 -Teils ausüben. Die hier erstmalig gezeigte Interaktion von AtpI_{Eco} mit AtpC_{Eco} (Abb. 20, Abb. 25) stützt diese These.

AtpC reguliert die Aktivität der F_1F_0 -ATPase (Kato *et al.*, 1997; Kato-Yamada *et al.*, 1999) und AtpI könnte diese Regulation durch die Interaktion mit AtpC (Abb. 20, Abb. 25) beeinflussen. Betrachtet man Bau und Funktionsweise der F_1F_0 -ATPase wird deutlich, dass keine ATP-Hydrolyse oder –Synthese stattfinden kann, solange AtpI gleichzeitig mit AtpE und AtpC interagiert (Abb. 30; Walker, 2012). Dies wäre zum Beispiel während des Zusammenbaus, unter Stress-Bedingungen oder als Anpassung an einen bestimmten Lebensraum eine mögliche Funktion von AtpI . Wenn das Protein nur beim Zusammenbau eine Rolle spielt und vom fertigen Enzym dissoziiert, erklärt sich warum AtpI nach der

Reinigung des Enzyms nicht Teil des Komplexes ist (Brusilow *et al.*, 1981; Cook *et al.*, 2003; Foster *et al.*, 1980). Dies stünde auch in Einklang mit der Beobachtung, dass AtpI_{Eco} in geringeren Mengen synthetisiert wird als die F_1F_0 -ATPase (Solomon *et al.*, 1989). Wenn AtpI keine dauerhafte Komponente des fertigen Enzyms ist, kann ein AtpI bzw. ein AtpI -Dimer den Zusammenbau mehrerer Enzyme unterstützen.

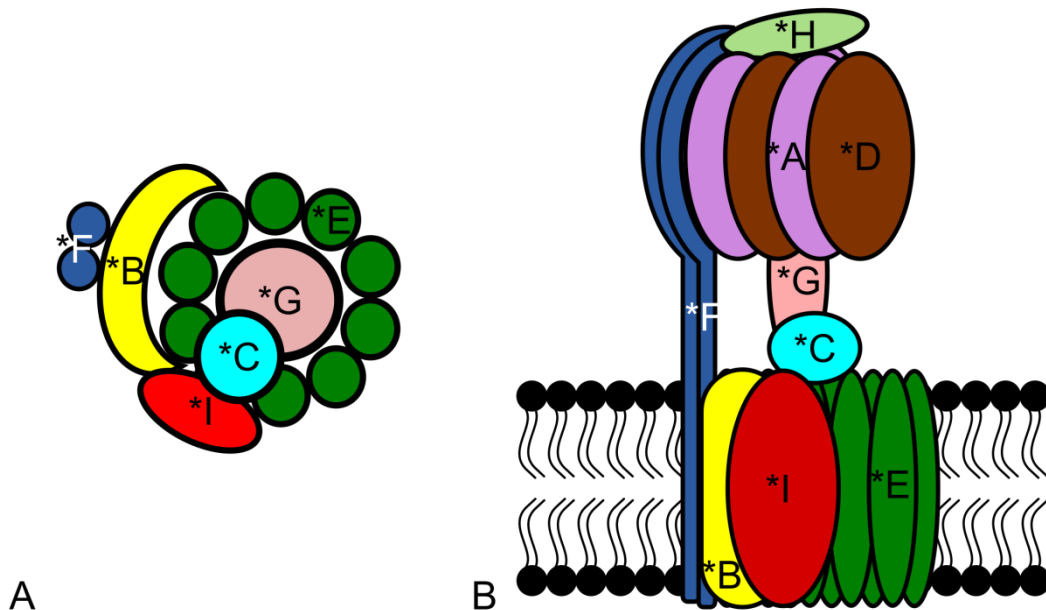


Abb. 30: Modell der Interaktion von AtpI_{Eco} mit der F_1F_0 -ATPase.

Die mögliche Lage von AtpI_{Eco} (*I) wurde nach den bisher gewonnenen Erkenntnissen eingezeichnet. Demnach interagiert AtpI_{Eco} mit AtpE_{Eco} (*E; Bley, 2014) und AtpC_{Eco} (*C, Abb. 20, Abb. 25) und befindet sich zumindest in räumlicher Nähe zu AtpB_{Eco} (*B) und AtpF_{Eco} (*F, Abb. 20). (A) zeigt die Aufsicht des membranständigen F_0 -Komplexes und die mit dem AtpE -Ring interagierenden Untereinheiten AtpG (*G) und AtpC , während in (B) das Modell der vollständigen F_1F_0 -ATPase sowie die mögliche Lage von AtpI_{Eco} dargestellt ist. Die Abbildungen wurden nach den in Fillingame und Steed (2014), Morales-Rios *et al.* (2015) und Walker (2012) zusammengefassten Erkenntnissen erstellt.

Neben der Beeinflussung der Aktivität der F_1F_0 -ATPase könnte die Interaktion von AtpI_{Eco} mit AtpC_{Eco} auch auf eine andere Funktion hindeuten. AtpC_{Eco} ist während des Zusammenbaus des Enzyms auch wichtig für die Interaktion von F_1 mit F_0 (Klionsky *et al.*, 1984). Im Gegensatz zu dem Protein des thermophilen *Bacillus* PS3 (Kato *et al.*, 1997), dissoziiert AtpC_{Eco} *in vitro* vom F_1 -Komplex (Laget und Smith, 1979). AtpI_{Eco} könnte den Komplex *in vivo* während des Zusammenbaus über eine Interaktion mit AtpC_{Eco} und AtpE_{Eco} stabilisieren. In *B. pseudofirmus* OF4 wurde schon gezeigt, dass AtpI die Verbindung des F_1 - mit dem F_0 -Komplex unterstützt (Liu *et al.*, 2013).

Die hohe Diversität in der Aminosäuresequenz von AtpI (Koumandou und Kossida, 2014) gibt einen Hinweis darauf, dass AtpI in verschiedenen Organismen unterschiedliche Aufgaben übernimmt. Die F_1F_0 -ATPase von *Caldalkalibacillus thermarum* synthetisiert ATP, hydrolysiert es aber nur nach Stimulation *in vitro* (Cook *et al.*, 2003). Weder AtpG noch ATP gebundenes AtpC sind in diese Inhibierung der Hydrolyse-Aktivität involviert (Ferguson *et al.*, 2016). Stattdessen könnte, neben strukturellen Besonderheiten, AtpI beteiligt sein. Experimentelle Hinweise darauf gibt es bisher allerdings nicht.

4.6 Die physiologische Funktion von AtpI

Wenn AtpI eine wichtige Rolle während des Zusammenbaus der F_1F_0 -ATPase oder bei der Regulation der Enzymfunktion unter bestimmten Bedingungen wie Stress spielt, wäre ein Phänotyp für die *atpI_{Eco}* Deletion nachweisbar. Alle bisher beobachteten Effekte von *atpI_{Eco}*-Deletionsmutanten konnten nicht bestätigt oder auf die Funktion von *atpI_{Eco}* zurückgeführt werden (Gay, 1984; Hsu und Brusilow, 1995; Jensen und Michelsen, 1992; Von Meyenburg *et al.*, 1982). Auch das in dieser Arbeit beobachtete geringe Wachstumsdefizit einer *atpI_{Eco}*-Deletionsmutante gegenüber dem Wildtyp bei einer Änderung des pH-Werts des Wachstumsmediums von pH 6,0 auf pH 8,0 kann wegen der fehlenden Komplementation nicht eindeutig auf die Deletion zurückgeführt werden (Abb. 26). Der Komplementationsstamm wurde nach dem gleichen Protokoll hergestellt wie ECB174, der nachweislich das Fusionsprotein synthetisierte (Abb. 19). Da kein Antikörper gegen AtpI_{Eco} vorhanden war, konnte dessen Synthese in ECB179 nicht nachgewiesen werden. Daher sollte in folgenden Experimenten zunächst mittels RT-PCR geprüft werden, ob *atpI_{Eco}* transkribiert wird.

Wenn *atpI_{Eco}* in ECB179 nicht in zu BW25113 vergleichbaren Mengen transkribiert wird, sollte *atpI_{Eco}* zusammen mit *atpB_{Eco}* chromosomal integriert werden. Die Translation von *atpB_{Eco}* wird von der *atpI_{Eco}*-mRNA beeinflusst (Hsu und Brusilow, 1995). Daher ist auch andersherum ein Einfluss von *atpB_{Eco}* auf die Translation von *atpI_{Eco}* möglich und bedarf einer Prüfung. Eine andere Lösung könnte sein die mRNA-Stabilität von *atpI_{Eco}* zu erhöhen, da sie aufgrund der Sekundärstruktur-Bildung und den RNase E-Schnittstellen gegenüber anderen Genen des Operons verringert ist (McCarthy, 1988; Schaefer *et al.*, 1989). Um die Stabilität zu erhöhen gäbe es verschiedene Möglichkeiten. Indem man den C-Terminus der RNase E deletiert, kann man dessen Funktion der mRNA-Degradierung ausschalten und gleichzeitig die essentielle Funktion der rRNA-Reifung behalten (Bernstein *et al.*, 2004; Ghora und Apirion, 1978; Lopez *et al.*, 1999; Misra und Apirion, 1979). Da RNase E in *E.*

coli eine zentrale Rolle beim Abbau von mRNA spielt (Bernstein *et al.*, 2004; Deutscher, 2006), führt die Deletion des C-Terminus der RNase E zu einer Vielzahl zusätzlicher Effekte. Dazu gehören ein vermindertes Wachstum (Leroy *et al.*, 2002), das Akkumulieren von RNA, welche mit Hilfe der RNase E, RhlB und der PNPase degradiert wird (Coburn *et al.*, 1999; Py *et al.*, 1996), sowie das Akkumulieren von RNA deren Abbau über sRNAs und Hfq reguliert wird (Massé *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005; Vogel und Luisi, 2011). Eine andere Möglichkeit wäre die *atpI_{Eco}*-mRNA-Stabilität direkt zu erhöhen. Dazu könnte man am 5'-Ende durch Punktmutationen eine Stamm-Schleifen-Struktur einfügen, um das Binden der RNase E zu verhindern (Baker und Mackie, 2003; Bouvet und Belasco, 1992; Emory und Belasco, 1990; Emory *et al.*, 1992; Hansen *et al.*, 1994). Da RNase E auf zwei verschiedene Arten die mRNA binden kann (Baker und Mackie, 2003; Mackie, 2013), sollten zusätzlich die RNase E-Schnittstellen innerhalb der kodierenden Sequenz von *atpI_{Eco}* mutiert werden (Abb. 2; McCarthy *et al.*, 1991; Schaefer *et al.*, 1989). Dieses Prinzip könnte auch verwendet werden, um den Einfluss höherer Mengen an AtpI_{Eco} auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen. Auf diese Weise würde man auch den Effekt umgehen, dass stark exprimierte Membranproteine Stress auf die Zelle ausüben und zu vermindertem bis keinem Wachstum führen (Von Meyenburg *et al.*, 1984; Monticello *et al.*, 1992). Man kann die Translation von AtpI_{Eco} ebenfalls erhöhen, indem man die Ribosomenbindestelle von *atpI_{Eco}* mit der von *atpE_{Eco}* austauscht (McCarthy, 1990). Eine erhöhte Synthese von AtpI_{Eco} könnte bei pH-Stress zu einem Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp führen.

4.6.1 Eine mögliche Funktion von AtpI bei pH-Wert-Schwankungen

Der mit pH-Änderung einhergehende Wachstumsunterschied schien nicht auf einer durch den pH-Wechsel ausgelösten Störung der *proton motive force* zu beruhen (Abb. 28). Inhibitoren wie DNP und Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon werden eingesetzt, um das Membranpotential und den Protonengradienten über der Membran aufzuheben (Ganas *et al.*, 2007; Linsinger *et al.*, 1999; McLaughlin, 1972; Wilharm *et al.*, 2004). Das mit steigender Konzentration an DNP beobachtete verminderte Wachstum von BW25113 und ECB178 könnte an einer weiteren Wirkung des Ionophors liegen. Durch die ebenfalls gestörte Translokation von Proteinen akkumulieren vor allem Membranproteine im Zytoplasma, was zur Induktion der Hitzeschockantwort führt (Gage und Neidhardt, 1993; Jana *et al.*, 2009; Weiner und Modelt, 1994). Zusätzlich wirkte sich auch das Ethanol, indem DNP gelöst war, negativ auf das Wachstum aus (Abb. 28).

4 Diskussion

Anders als DNP hatte die Glukosekonzentration im Medium einen geringen Einfluss auf das Wachstum nach einem pH-Wechsel. Bei niedriger Glukosekonzentration war das Wachstum langsamer und kein Unterschied zwischen BW25113 und ECB178 zu erkennen (Abb. 27, Tab. A 2). Schnelleres Wachstum und damit eine erhöhte Proteinsynthese könnte eine erhöhte Fehlerrate beim Zusammenbau der F_1F_o -ATPase bewirken und in Zusammenhang mit der *atpI_{Eco}*-Deletion zu vermindertem Wachstum führen. Das Ergebnis könnte demnach dafür sprechen, dass *AtpI_{Eco}* eine Rolle beim Zusammenbau der F_1F_o -ATPase spielt. In Bakterien ist der Zusammenbau der F_1F_o -ATPase noch nicht vollständig geklärt. Proteine wie *YidC_{Eco}* und die Sec-Translokase, die den Zusammenbau der F_1F_o -ATPase unterstützen (Van der Laan *et al.*, 2004b; Kol *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2004), könnten den Verlust von *AtpI_{Eco}* komplementieren. Dies könnte die Ursache sein, warum bisher kein Phänotyp für die Deletion von *atpI_{Eco}* sichtbar wurde. Eine Beteiligung von *AtpI_{Eco}* am Zusammenbau lässt sich nur schwer nachweisen. Da *YidC* sowie die Sec-Translokase die Integration vieler verschiedener Proteine in die Membran unterstützen, löst eine Deletion einen starken Phänotyp aus (Dalbey *et al.*, 2014; Lycklama a Nijeholt und Driessen, 2012). Die zusätzliche Deletion von *atpI_{Eco}* könnte vermutlich nicht mehr von diesen Phänotypen unterschieden werden. Man könnte versuchen nach dem Protokoll von Hilbers *et al.* eine Beteiligung von *AtpI_{Eco}* am Zusammenbau der F_1F_o -ATPase zu untersuchen (Hilbers *et al.*, 2013). Dabei müssten sowohl *YidC_{Eco}* als auch *AtpI_{Eco}* zeitlich versetzt synthetisiert werden.

4.7 Ausblick

Die Medizin steht vor einer großen Anzahl an Herausforderungen. Ein Ziel ist es, Pathogene gezielt zu bekämpfen. In den letzten Jahren hat man unter anderem die F_1F_0 -ATPase als Angriffspunkt für neue Medikamente genutzt (Ahmad and Laughlin, 2010; Ahmad *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014). Aufgrund der geringen Konservierung der Aminosäuresequenz von AtpI könnte sich auch dieses Protein als Ziel für Inhibitoren eignen, sofern es in Pathogenen essentiell ist. Dafür ist aber zunächst ein besseres Verständnis der Funktion von AtpI und dessen Interaktion mit der F_1F_0 -ATPase nötig.

Um neue Einblicke in die Funktionsweise von AtpI zu erhalten, könnte man untersuchen, ob AtpI als Monomer oder Multimer Interaktionen mit einzelnen Untereinheiten der F_1F_0 -ATPase eingeht. Dafür wäre eine Inkubation gereinigter Proteine mit anschließender Nativ-PAGE geeignet, um das Molekulargewicht des Komplexes zu bestimmen. Wenn bestätigt wird, dass AtpI als Multimer Interaktionen eingeht, lässt sich mit *Cross-Link*-Experimenten nach dem von Brandt *et al.* (2013a) verwendeten Protokoll genauer analysieren, welche Domänen von AtpI an der Bindung von Untereinheit der F_1F_0 -ATPase beteiligt sind. Damit ließe sich die Massenspektrometrie kombinieren, die auch eine Analyse instabiler Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht (Sinz *et al.*, 2015). Dass eine Interaktion von AtpI mit der F_1F_0 -ATPase in der Vergangenheit angezweifelt wurde (Brusilow *et al.*, 1981; Foster *et al.*, 1980), deutet darauf hin, dass die Interaktion zumindest in *E. coli* nicht stabil bzw. permanent ist. Damit wäre diese Methode besonders gut geeignet um AtpI_{Ec} und die Interaktion mit der F_1F_0 -ATPase genauer zu untersuchen.

Zusätzlich zur Multimerbildung würde die Untersuchung der Stöchiometrie von AtpI gegenüber der F_1F_0 -ATPase klären, ob das Protein permanenter Bestandteil des Enzyms sein kann. Bisher sprechen viele Daten für die These, dass AtpI eine Rolle beim Zusammenbau der F_1F_0 -ATPase spielt. Dafür könnte AtpI in einem Verhältnis geringer als 1:1 zur F_1F_0 -ATPase stehen.

Es wäre auch interessant zu untersuchen, ob Stress wie zum Beispiel ein pH-Schock Einfluss auf die Stärke der Interaktionen von AtpI mit anderen Proteinen hat. Unter diesen Bedingungen könnte AtpI eine wichtigere Rolle für den Zusammenbau spielen: entweder als Chaperon-ähnliches Protein oder um die Aktivität der F_1F_0 -ATPase zu inhibieren, bis sie vollständig zusammengebaut ist.

5 Zusammenfassung

Vor 36 Jahren wurde *atpI* entdeckt, das erste Gen im *atp*-Operon von *E. coli*. Trotz intensiver Forschung ist seine Funktion bis heute nicht geklärt. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von *atpI* in *E. coli* und *C. metallidurans* für die F₁F_o-ATPase untersucht. In beiden Organismen existiert ein starker, konstitutiver Promotor vor *atpI*, auf den mindestens ein schwächerer Promotor folgt. Die physiologische Bedeutung der schwächeren Promotoren bleibt unklar, da ihre Aktivität unter den hier getesteten Bedingungen unverändert ist.

Reportergenfusionen zeigen, dass *atpI* nicht nur exprimiert, sondern AtpI auch synthetisiert wird. Die Menge an AtpI in der Zelle ist geringer als die von AtpE (c-Untereinheit) und gleicht in *E. coli* der von AtpB (a-Untereinheit). AtpI wird über die ganze Zelle verteilt in die Membran integriert. Protein-Protein-Interaktionsstudien belegen, dass AtpI_{Eco} ein Multimer bildet. Unter anderem scheinen die Aminosäuren S39, G43, E79 und K82 für die Ausbildung des AtpI-Multimers von Bedeutung zu sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass AtpI mit AtpE Na⁺-abhängiger F₁F_o-ATPasen interagiert. Dies wurde nun ebenfalls für die H⁺-abhängige F₁F_o-ATPase von *E. coli* gezeigt. Zudem interagiert AtpI_{Eco} als Multimer mit AtpC_{Eco} (ε-Untereinheit). Eine Interaktion von AtpI_{Eco} mit AtpF_{Eco} und AtpH_{Eco} besteht nicht. Dies stützt die Hypothese, dass AtpI eine Rolle beim Zusammenbau des AtpE-Rings oder der Stabilisierung der F₁F_o-ATPase spielt. Es könnte aber auch eine Funktion bei der Regulation der Enzym-Aktivität ausüben.

Auf physiologischer Ebene wurde bisher kein Effekt einer *atpI*-Deletion identifiziert. Die vorliegende Arbeit zeigt ein geringes Wachstumsdefizit einer *atpI*_{Eco}-Deletionsmutante gegenüber dem Wildtyp bei pH-Wechsel von pH 8,0 auf pH 6,0, das mit zunehmender Glukosekonzentration steigt. Der Effekt konnte allerdings nicht komplementiert werden.

Die Diversität der Aminosäuresequenz von AtpI verschiedener Organismen macht es möglich, dass AtpI in unterschiedlichen Organismen unterschiedliche Funktionen ausübt. AtpI_{Cmet} weist zum Beispiel eine Domäne am N-Terminus auf, die AtpI_{Eco} fehlt. Es ist demnach möglich, dass die Funktion von AtpI in Anpassung an verschiedene Lebensräume ebenso vielfältig ist.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. und Walker, J. E.** (1994). Structure at 2.8Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 370: 621–628.
- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A. und Enriquez, J. A.** (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, 32: 529–539.
- Ackrell, B. C.** (2000). Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS Letters*, 466: 1–5.
- Adachi, K., Oiwa, K., Nishizaka, T., Furuike, S., Noji, H., Itoh, H., Yoshida, M. und Kinoshita Jr., K.** (2007). Coupling of Rotation and Catalysis in F₁-ATPase Revealed by Single-Molecule Imaging and Manipulation. *Cell*, 130: 309–321.
- Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Harada, Y., Yoshida, M., Kinoshita, K. und Boyer, P. D.** (2000). Stepping rotation of F₁-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 7243–7247.
- Aggeler, R., Ogilvie, I. und Capaldi, R. A.** (1997). Rotation of a γ - ϵ Subunit Domain in the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP Synthase Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 19621–19624.
- Ahmad, Z. und Laughlin, T. F.** (2010). Medicinal chemistry of ATP synthase: a potential drug target of dietary polyphenols and amphibian antimicrobial peptides. *Current Medicinal Chemistry*, 17: 2822–2836.
- Ahmad, Z., Okafor, F., Azim, S. und Laughlin, T. F.** (2013). ATP synthase: a molecular therapeutic drug target for antimicrobial and antitumor peptides. *Current Medicinal Chemistry*, 20: 1956–1973.
- Akiyama, Y. und Ito, K.** (1989). Export of *Escherichia coli* alkaline phosphatase attached to an integral membrane protein, SecY. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 437–442.
- Akiyama, Y., Ito, K. und Schwartz, M.** (1987). Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 6: 3465–3470.
- Alberge, F., Espinosa, L., Seduk, F., Sylvi, L., Toci, R., Walburger, A. und Magalon, A.** (2015). Dynamic subcellular localization of a respiratory complex controls bacterial respiration. *eLife*, 4: 1–14.
- Allegretti, M., Klusch, N., Mills, D. J., Vonck, J., Kühlbrandt, W. und Davies, K. M.** (2015). Horizontal membrane-intrinsic alpha-helices in the stator a-subunit of an F-type ATP

synthase. *Nature*, 521: 237–240.

Anderson, P. M. (1980). Purification and properties of the inducible enzyme cyanase. *Biochemistry*, 19: 2882–2888.

Anderson, R. L. und Wood, W. A. (1969). Carbohydrate metabolism in microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 23: 539–578.

Angevine, C. M. und Fillingame, R. H. (2003). Aqueous access channels in subunit a of rotary ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 6066–6074.

Angevine, C. M., Herold, K. A. G., Fillingame, R. H. und Kaback, H. R. (2003). Aqueous access pathways in subunit a of rotary ATP synthase extend to both sides of the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 13179–13183.

Angov, E. und Brusilow, W. (1988). Use of *lac* fusions to measure *in vivo* regulation of expression of *Escherichia coli* proton-translocating ATPase (*unc*) genes. *Journal of Bacteriology*, 170: 459–462.

Arechaga, I., Miroux, B., Runswick, M. J. und Walker, J. E. (2003). Over-expression of *Escherichia coli* F₁F₀-ATPase subunit a is inhibited by instability of the *uncB* gene transcript. *FEBS letters*, 547: 97–100.

Aronson, D. E., Costantini, L. M. und Snapp, E. L. (2011). Superfolder GFP Is Fluorescent in Oxidizing Environments When Targeted via the Sec Translocon. *Traffic*, 12: 543–548.

Asnis, R. E. und Brodie, A. F. (1953). A Glycerol Dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 203: 153–159.

Bahr, J. (2014). Untersuchung der Interaktion von AtpI mit den Bestandteilen des F₀-Komplexes. MLU Halle-Wittenberg.

Bajar, B., Wang, E., Zhang, S., Lin, M. und Chu, J. (2016). A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors*, 16. doi: 10.3390/s16091488.

Baker, K. E. und Mackie, G. A. (2003). Ectopic RNase E sites promote bypass of 5'-end-dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 47: 75–88.

Ballhausen, B., Altendorf, K. und Deckers-Hebestreit, G. (2009). Constant c10 Ring Stoichiometry in the *Escherichia coli* ATP Synthase Analyzed by Cross-Linking. *Journal of Bacteriology*, 191: 2400–2404.

von Ballmoos, C., Wiedenmann, A. und Dimroth, P. (2009). Essentials for ATP synthesis by F₁F₀ ATP synthases. *Annual Review of Biochemistry*, 78: 649–672.

Barriuso-Iglesias, M., Barreiro, C., Flechoso, F. und Martín, J. F. (2006). Transcriptional analysis of the F₀F₁ ATPase operon of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 reveals strong induction by alkaline pH. *Microbiology*, 152: 11–21.

- Barriuso-Iglesias, M., Schluesener, D., Barreiro, C., Poetsch, A. und Martín, J. F.** (2008). Response of the cytoplasmic and membrane proteome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 to pH changes. *BMC Microbiology*, 8. doi: 10.1186/1471-2180-8-225.
- Bassford, P. J., Silhavy, T. J. und Beckwith, J. R.** (1979). Use of Gene Fusion to Study Secretion of Maltose-Binding Protein into *Escherichia coli* Periplasm. *Journal of Bacteriology*, 139: 19–31.
- Battesti, A. und Bouveret, E.** (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods*, 58: 325–34.
- Belli, W. A. und Marquis, R. E.** (1991). Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to Acid Stress in Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1134–1138.
- Bender, G. R., Sutton, S. V. W. und Marquis, R. E.** (1986). Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infection and Immunity*, 53: 331–338.
- Bernstein, J. A., Lin, P.-H., Cohen, S. N. und Lin-Chao, S.** (2004). Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 2758–2763.
- Berry, E. A. und Trumpower, B. L.** (1985). Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome *bc*₁ and cytochrome *c-aa*₃ complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 2458–2467.
- Betts, M. J. und Russell, R. B.** (2003). Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. in Barnes, M. R. and Gray, I. C. (eds) *Bioinformatics for Geneticists*. John Wiley and Sons, Ltd., 289–316.
- Birkenhager, R., Hoppert, M., Deckers-Hebestreit, G., Mayer, F. und Altendorf, K.** (1995). The F_o complex of the *Escherichia coli* ATP synthase Investigation by electron spectroscopic imaging and immunoelectron microscopy. *European Journal of Biochemistry*, 230: 58–67.
- Bley, S.** (2014). Die Funktion des Proteins AtpI in *Escherichia coli*. MLU Halle-Wittenberg.
- Booth, I. R.** (2005). Glycerol and Methylglyoxal Metabolism. *EcoSal Plus*, 1. doi: 10.1128/ecosalplus.3.4.3.
- Bouvet, P. und Belasco, J. G.** (1992). Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *E. coli*. *Nature*, 360: 488–491.
- Boyd, D., Manoil, C. und Beckwith, J.** (1987). Determinants of membrane protein topology. *Genetics*, 84: 8525–8529.

- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Brandt, K., Maiwald, S., Herkenhoff-Hesselmann, B., Gnirß, K., Greie, J. C., Dunn, S. D. und Deckers-Hebestreit, G.** (2013a). Individual interactions of the b subunits within the stator of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 288: 24465–24479.
- Brandt, K., Müller, D. B., Hoffmann, J., Hübner, C., Brutschy, B., Deckers-Hebestreit, G. und Müller, V.** (2013b). Functional production of the Na⁺ F₁F₀ ATP synthase from *Acetobacterium woodii* in *Escherichia coli* requires the native AtpI. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 45: 15–23.
- Brockmann, B., Koop genannt Hoppmann, K. D., Strahl, H. und Deckers-Hebestreit, G.** (2013). Time-delayed *in vivo* assembly of subunit a into preformed *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase. *Journal of Bacteriology*, 195: 4074–84.
- Broome-Smith, J. K. und Spratt, B. G.** (1986). A vector for the construction of translational fusions to TEM beta-lactamase and the analysis of protein export signals and membrane protein topology. *Gene*, 49: 341–349.
- Brusilow, W., Porter, A. und Simoni, R.** (1983). Cloning and expression of *uncI*, the first gene of the *unc* operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 155: 1265–1270.
- Brusilow, W. S. A., Gunsalus, R. P., Hardeman, E. C., Decker, K. P. und Simoni, R. D.** (1981). *In Vitro* Synthesis of the F₀ and F₁ Components of the Proton Translocating ATPase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 256: 3141–3144.
- Brusilow, W. S. A., Klionsky, D. J. und Simon, R. D.** (1982). Differential polypeptide synthesis of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 151: 1363–1371.
- Bulygin, V. V., Duncan, T. M. und Cross, R. L.** (2004). Rotor/stator interactions of the ε subunit in *Escherichia coli* ATP synthase and implications for enzyme regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 35616–35621.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A. und Tsien, R. Y.** (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 7877–7882.
- Capaldi, R. A. und Aggeler, R.** (2002). Mechanism of the F₁F₀-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends in Biochemical Sciences*, 27: 154–160.
- Cecchini, G., Schröder, I., Gunsalus, R. P. und Maklashina, E.** (2002). Succinate

- dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1553: 140–157.
- Chalfie, M.** (1995). Green fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology*, 62: 651–656.
- Chen, J. C., Viollier, P. H. und Shapiro, L.** (2005). A membrane metalloprotease participates in the sequential degradation of a *Caulobacter* polarity determinant. *Molecular Microbiology*, 55: 1085–1103.
- Choi, K.-H., Gaynor, J. B., White, K. G., Lopez, C., Bosio, C. M., Karkhoff-Schweizer, R. R. und Schweizer, H. P.** (2005). A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nature Methods*, 2: 443–448.
- Choi, K.-H. und Schweizer, H. P.** (2006). mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Protocols*, 1: 153–161.
- Clark, B. F. C. und Marcker, K. A.** (1966). The Role of N-Formyl-methionyl-sRNA in Protein Biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*, 17: 394–406.
- Coburn, G. A., Miao, X., Briant, D. J. und Mackie, G. A.** (1999). Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes and Development*, 13: 2594–2603.
- Cook, G. M., Keis, S., Morgan, H. W., Ballmoos, C. von, Matthey, U., Kaim, G. und Dimroth, P.** (2003). Purification and biochemical characterization of the F₁F₀-ATP synthase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TA2. A1. *Journal of Bacteriology*, 185: 4442–4449.
- Dalbey, R. E., Kuhn, A., Zhu, L. und Kiefer, D.** (2014). The membrane insertase YidC. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843: 1489–1496.
- Dammeyer, T. und Tinnefeld, P.** (2012). Engineered fluorescent proteins illuminate the bacterial periplasm. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3. doi: 10.5936/csbj.201210013.
- Dashper, S. G. und Reynolds, E. C.** (1992). pH Regulation by *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, 71: 1159–1165.
- Datsenko, K. A. und Wanner, B. L.** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 6640–6645.
- Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J. D., Kühlbrandt, W. und Henderson, R.** (2012). Structure of the yeast F₁F₀-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 13602–

13607.

Decker, K. P., Brusilow, W. S. A., Gunsalus, R. P. und Simoni, R. D. (1982). *In vitro* membrane association of the F₀ polypeptides of the *Escherichia coli* proton translocating ATPase. *Journal of Bacteriology*, 152: 815–821.

Deckers-Hebestreit, G. (2013). Assembly of the *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase involves distinct subcomplex formation. *Biochemical Society Transactions*, 41: 1288–1293.

Dehal, P. S., Joachimiak, M. P., Price, M. N., Bates, J. T., Baumohl, J. K., Chivian, D., Friedland, G. D., Huang, K. H., Keller, K., Novichkov, P. S., Dubchak, I. L., Alm, E. J. und Arkin, A. P. (2009). MicrobesOnline: An integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkp919.

Delgado, L., Martínez, G., López-Iglesias, C. und Mercadé, E. (2015). Cryo-electron tomography of plunge-frozen whole bacteria and vitreous sections to analyze the recently described bacterial cytoplasmic structure, the Stack. *Journal of Structural Biology*, 189: 220–229.

Derman, A. I. und Beckwith, J. (1991). *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *Journal of Bacteriology*, 173: 7719–7722.

Deutscher, M. P. (2006). Degradation of RNA in bacteria: Comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Research*, 34: 659–666.

Diels, L., Van Roy, S., Taghavi, S. und Van Houdt, R. (2009). From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96: 247–258.

Dimroth, P. und von Ballmoos, C. (2008). ATP synthesis by decarboxylation phosphorylation. in Günter Schäfer and Harvey S. Penefsky (eds) *Bioenergetics. Results and Problems in Cell Differentiation*. Springer Berlin Heidelberg, 153–184.

Dinh, T. und Bernhardt, T. G. (2011). Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies. *Journal of Bacteriology*, 193: 4984–4987.

Dmitriev, O., Jones, P. C., Jiang, W. und Fillingame, R. H. (1999). Structure of the Membrane Domain of Subunit b of the *Escherichia coli* F₀F₁ ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 15598–15604.

Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16: 6127–6145.

Downie, J. A., Cox, G. B., Langman, L., Ash, G., Becker, M. und Gibson, F. (1981). Three genes coding for subunits of the membrane sector (F₀) of the *Escherichia coli*

adenosine triphosphatase complex. *Journal of Bacteriology*, 145: 200–210.

Downie, J. A., Langman, L., Cox, G. B., Yanofsky, C. und Gibson, F. (1980). Subunits of the adenosine triphosphatase complex translated *in vitro* from the *Escherichia coli unc* operon. *Journal of Bacteriology*, 143: 8–17.

Downie, J. A., Senior, A. E., Gibson, F. und Cox, G. B. (1979). A fifth gene (*uncE*) in the operon concerned with oxidative phosphorylation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 137: 711–718.

Drew, D., Sjöstrand, D., Nilsson, J., Urbig, T., Chin, C.-N., De Gier, J.-W., Von Heijne, G. und Beckwith, J. (2002). Rapid topology mapping of *Escherichia coli* inner-membrane proteins by prediction and PhoA/GFP fusion analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 2690–2695.

Dunn, S. D. (1992). The polar domain of the b subunit of *Escherichia coli* F₁F₀-ATPase forms an elongated dimer that interacts with the F₁ Sector. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 7630–7636.

Dunn, S. D. und Futai, M. (1980). Reconstitution of a Functional Coupling Factor from the Isolated Subunits of *Escherichia coli* F₁ ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 113–118.

Düser, M. G., Bi, Y., Zarrabi, N., Dunn, S. D. und Börsch, M. (2008). The proton-translocating a subunit of F₀F₁-ATP synthase is allocated asymmetrically to the peripheral stalk. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 33602–33610.

Emory, S. A. und Belasco, J. G. (1990). The *ompA* 5' untranslated RNA segment functions in *Escherichia coli* as a growth-rate-regulated mRNA stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency. *Journal of Bacteriology*, 172: 4472–4481.

Emory, S. A., Bouvet, P. und Belasco, J. G. (1992). A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes and Development*, 6: 135–148.

Emr, S. D. und Silhavy, T. J. (1980). Mutations Affecting Localization of An *Escherichia coli* Outer Membrane Protein, the Bacteriophage λ Receptor. *Journal of Molecular Biology*, 141: 63–90.

Erhardt, H., Dempwolff, F., Pfreundschuh, M., Riehle, M., Schäfer, C., Pohl, T., Graumann, P. und Friedrich, T. (2014). Organization of the *Escherichia coli* aerobic enzyme complexes of oxidative phosphorylation in dynamic domains within the cytoplasmic membrane. *MicrobiologyOpen*, 3: 316–326.

Eya, S., Maeda, M., Tomochika, K., Kanemasa, Y. und Futai, M. (1989). Overproduction of truncated subunit a of H⁺-ATPase causes growth inhibition of *Escherichia coli*. *Journal of*

Bacteriology, 171: 6853–6858.

Fayle, B. D. R. H., Downie, J. A., Cox, G. B., Gibson, F. und Radik, J. (1978). Characterization of the Mutant-*uncD*-Gene Product in a Strain of *Escherichia coli* K12. *Biochemical Journal*, 172: 523–531.

Feilmeier, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. und Phillips, G. J. (2000). Green Fluorescent Protein Functions as a Reporter for Protein Localization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182: 4068–4076.

Ferguson, S. A., Cook, G. M., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. und Walker, J. E. (2016). Regulation of the thermoalkaliphilic F₁-ATPase from *Caldalkalibacillus thermarum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113: 10860–10865.

Fillingame, R. H., Angevine, C. M. und Dmitriev, O. Y. (2002). Coupling proton movements to c-ring rotation in F₁F₀ ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a–c interface. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1555: 29–36.

Fillingame, R. H., Oldenburg, M. und Fraga, D. (1991). Mutation of alanine 24 to serine in subunit c of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP synthase reduces reactivity of aspartyl 61 with dicyclohexylcarbodiimide. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 20934–20939.

Fillingame, R. H. und Steed, P. R. (2014). Half channels mediating H⁺ transport and the mechanism of gating in the F₀ sector of *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837: 1063–1068.

Foster, D. L. und Fillingame, R. H. (1982). Stoichiometry of Subunits in the H⁺-ATPase Complex of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 257: 2009–2015.

Foster, D. L., Mosher, M. E., Futai, M. und Fillingame, R. H. (1980). Subunits of the H⁺-ATPase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 255: 12037–12041.

Frelet, A. und Klein, M. (2006). Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Letters*, 580: 1064–1084.

Freudl, R., Schwarz, H., Kramps, S., Hindennach, I. und Henning, U. (1988). Dihydrofolate Reductase (*Mouse*) and Beta-Galactosidase (*Escherichia coli*) Can Be Translocated across the Plasma Membrane of *E. coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 17084–17091.

Froshauer, S., Green, G. N., Boyd, D., McGovern, K. und Beckwith, J. (1988). Genetic Analysis of the Membrane Insertion and Topology of MalF, a Cytoplasmic Membrane Protein of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 200: 501–511.

Fukui, T., Ohsawa, K., Mifune, J., Orita, I. und Nakamura, S. (2011). Evaluation of promoters for gene expression in polyhydroxyalkanoate- producing *Cupriavidus necator* H16.

Applied Microbiology and Biotechnology, 89: 1527–1536.

Gage, D. J. und Neidhardt, F. C. (1993). Adaptation of *Escherichia coli* to the Uncoupler of Oxidative. *Journal of Bacteriology*, 175: 7105–7108.

Gajadeera, C. S. und Weber, J. (2013). *Escherichia coli* F₁F₀-ATP Synthase with a b/δ fusion protein allows analysis of the function of the individual b subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 288: 26441–26447.

Ganas, P., Mihasan, M., Igloi, G. L. und Brandsch, R. (2007). A two-component small multidrug resistance pump functions as a metabolic valve during nicotine catabolism by *Arthrobacter nicotinovorans*. *Microbiology*, 153: 1546–1555.

Gandlur, S. M., Wei, L., Levine, J., Russell, J. und Kaur, P. (2004). Membrane topology of the DrrB protein of the doxorubicin transporter of *Streptomyces peucetius*. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 27799–27806.

García Montes de Oca, L. J. J., Chagolla-López, A., González De La Vara, L., Cabellos-Avelar, T., Gómez-Lojero, C., Berta, E. und Cirlos, G. (2012). The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44: 473–486.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. und Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. in Walker, J. M. (ed.) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, 571–607.

Gay, N. J. (1984). Construction and characterization of an *Escherichia coli* strain with a *uncI* mutation. *Journal of Bacteriology*, 158: 820–825.

Gay, N. J. und Walker, J. E. (1981a). The *atp* operon: nucleotide sequence of the promoter and the genes for the membrane proteins and the δ subunit of *Escherichia coli* ATP-synthase. *Nucleic Acids Research*, 9: 3919–3926.

Gay, N. J. und Walker, J. E. (1981b). The *atp* operon: nucleotide sequence of the region encoding the α-subunit of *Escherichia coli* ATP-synthase. *Nucleic Acids Research*, 9: 2187–2194.

Gentz, R., Langner, A., Changt, A. C. Y., Cohent, S. N. und Bujard, H. (1981). Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal. *Biochemistry*, 78: 4936–4940.

Georgiadou, M., Castagnini, M., Karimova, G., Ladant, D. und Pelicic, V. (2012). Large-scale study of the interactions between proteins involved in type IV pilus biology in *Neisseria meningitidis*: Characterization of a subcomplex involved in pilus assembly. *Molecular Microbiology*, 84: 857–873.

- Gerstel, B. und McCarthy, J. E. G.** (1989). Independent and coupled translational initiation of *atp* genes in *Escherichia coli*: experiments using chromosomal and plasmid-borne *lacZ* fusions. *Molecular Microbiology*, 3: 851–859.
- Ghora, B. K. und Apirion, D.** (1978). Structural analysis and *in vitro* processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an *rne* mutant of *E. coli*. *Cell*, 15: 1055–1066.
- Girvin, M. E., Rastogi, V. K., Abildgaard, F., Markley, J. L. und Fillingame, R. H.** (1998). Solution Structure of the Transmembrane H⁺-Transporting Subunit c of the F₁F₀ ATP Synthase. *Biochemistry*, 37: 8817–8824.
- Gogol, E. P., Lücken, U. und Capaldi, R. A.** (1987). The stalk connecting the F₁ and F₀ domains of ATP synthase visualized by electron microscopy of unstained specimens. *FEBS Letters*, 219: 274–278.
- Goldberg, M., Pribyl, T., Juhnke, S. und Nies, D. H.** (1999). Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 26065–26070.
- Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K. und Vandamme, P.** (2001). Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle *et al.* 1998 emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1773–1782.
- Graf, S., Schmieden, D., Tschauer, K., Hunke, S. und Uden, G.** (2014). The sensor kinase Dcts forms a tripartite sensor unit with Dctb and Dcta for sensing C4-dicarboxylates in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 196: 1084–1093.
- Gray, T. M. und Matthews, B. W.** (1984). Intrahelical hydrogen bonding of serine, threonine and cysteine residues within alpha-helices and its relevance to membrane-bound proteins. *Journal of Molecular Biology*, 175: 75–81.
- Gross, G.** (1991). RNase E cleavage in the *atpE* leader region of *atpE*/Interferon- β hybrid transcripts in *Escherichia coli* causes enhanced rates of mRNA decay. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 17880–17884.
- Gunsalus, R. P., Brusilow, W. S. und Simoni, R. D.** (1982). Gene order and gene-polypeptide relationships of the proton-translocating ATPase operon (*unc*) of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79: 320–324.
- Hahn, A., Parey, K., Bublitz, M., Mills, D. J., Zickermann, V., Vonck, J., Kühlbrandt, W. und Meier, T.** (2016). Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. *Molecular Cell*, 63: 445–

456.

Haldenwang, W. G. (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiological reviews*, 59: 1–30.

Hansen, M. J., Chen, L.-H., Fejzo, M. L. S. und Belasco, J. G. (1994). The *ompA* 5' untranslated region impedes a major pathway for mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 12: 707–716.

Hara, K. Y., Kato-Yamada, Y., Kikuchi, Y., Hisabori, T. und Yoshida, M. (2001). The Role of the β DELSEED Motif of F₁-ATPase: Propagation of the inhibitory effect of the ϵ subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 23969–23973.

Hara, Y., Seki, M., Matsuoka, S., Hara, H., Yamashita, A. und Matsumoto, K. (2008). Involvement of PlsX and the acyl-phosphate dependent sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsY in the initial stage of glycerolipid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Genes and Genetic Systems*, 83: 433–442.

Hatch, L. P., Cox, G. B. und Howitt, S. M. (1995). The essential arginine residue at position 210 in the a subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase can be transferred to position 252 with partial retention of activity. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 29407–29412.

Hediger, M. A., Johnson, D. F., Nierlich, D. P. und Zabin, I. (1985). DNA sequence of the lactose operon: The *lacA* gene and the transcriptional termination region. *Biochemistry*, 82: 6414–6418.

Hermolin, J., Dmitriev, O. Y., Zhang, Y. und Fillingame, R. H. (1999). Defining the Domain of Binding of F₁ Subunit ϵ with the Polar Loop of F₀ Subunit c in the *Escherichia coli* ATP-Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 17011–17016.

Hermolin, J. und Fillingame, R. H. (1995). Assembly of F₀ Sector of *Escherichia coli* H⁺ ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 2815–2817.

Hermolin, J., Gallant, J. und Fillingame, R. H. (1983). Topology, Organization, and Function of the Psi Subunit in the F₀ Sector of the H⁺-ATPase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 14550–14555.

Hicks, D. B., Wang, Z., Wei, Y., Kent, R., Guffanti, A. A., Banciu, H., Bechhofer, D. H. und Krulwich, T. A. (2003). A tenth *atp* gene and the conserved *atpI* gene of a *Bacillus atp* operon have a role in Mg²⁺ uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 10213–10218.

Hilbers, F., Eggers, R., Pradela, K., Friedrich, K., Herkenhoff-Hesselmann, B., Becker, E. und Deckers-Hebestreit, G. (2013). Subunit δ is the key player for assembly of the H⁺-translocating unit of *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*,

288: 25880–25894.

Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. und Mitaku, S. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14: 378–379.

Hoffman, C. S. und Wright, A. (1985). Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: An approach for studying protein secretion. *Genetics*, 82: 5107–5111.

Hoffmann, M.-L. (2013). Expression des *atp* Operons von *Escherichia coli*. MLU Halle-Wittenberg.

Hsu, D. K. W. und Brusilow, W. S. A. (1995). Effects of the *uncl* gene on expression of *uncB*, the gene coding for the a subunit of the F₁F₀ ATPase of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 371: 127–131.

Huerta, A. M. und Collado-Vides, J. (2003). Sigma70 promoters in *Escherichia coli*: Specific transcription in dense regions of overlapping promoter-like signals. *Journal of Molecular Biology*, 333: 261–278.

Huynh, T. N., Chen, L.-L. und Stewart, V. (2015). Sensor–response regulator interactions in a cross-regulated signal transduction network. *Microbiology*, 161: 1504–1515.

Iino, R., Hasegawa, R., Tabata, K. V und Noji, H. (2009). Mechanism of inhibition by C-terminal alpha-helices of the epsilon subunit of *Escherichia coli* F₀F₁-ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 17457–64.

Ingledeu, W. J. und Poole, R. K. (1984). The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 48: 222–271.

Islam, S. T. und Lam, J. S. (2013). Topological mapping methods for alpha-helical bacterial membrane proteins - an update and a guide. *MicrobiologyOpen*, 2: 350–364.

Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. und Kinoshita, K. (2004). Mechanically driven ATP synthesis by F₁-ATPase. *Nature*, 427: 465–468.

Iwasaki, T., Matsuura, K. und Oshima, T. (1995a). Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7: I. The archaeal terminal oxidase supercomplex is a functional fusion of respiratory complexes III and IV with no c-type cytochromes. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 30881–30892.

Iwasaki, T., Wakagi, T., Isogai, Y., Iizuka, T. und Oshima, T. (1995b). Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7: II. characterization of the archeal terminal oxidase supercomplexes and implication for intramolecular electron transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 30893–30901.

Jain, C. (2002). Degradation of mRNA in *Escherichia coli*. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 54: 315–321.

- Jana, B., Panja, S., Saha, S. und Basu, T.** (2009). Mechanism of protonophores-mediated induction of heat-shock response in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 9. doi: 10.1186/1471-2180-9-20.
- Jaroslwiecka, A. und Piotrowska-Seget, Z.** (2014). Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology*, 160: 12–25.
- Javadpour, M. M., Eilers, M., Groesbeek, M. und Smith, S. O.** (1999). Helix packing in polytopic membrane proteins: role of glycine in transmembrane helix association. *Biophysical Journal*, 77: 1609–1618.
- Jawanda, N., Ebalunode, J., Gribenko, A., Briggs, J., Lee, J. C. und Tu, S. C.** (2008). A single-residue mutation destabilizes *Vibrio harveyi* flavin reductase FRP dimer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 472: 51–57.
- Jensen, P. R. und Michelsen, O.** (1992). Carbon and Energy Metabolism of *atp* Mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174: 7635–7641.
- Jeong, K. J., Kawarasaki, Y., Gam, J., Harvey, B. R., Iverson, B. L. und Georgiou, G.** (2004). A periplasmic fluorescent reporter protein and its application in high-throughput membrane protein topology analysis. *Journal of Molecular Biology*, 341: 901–909.
- Jiang, W. und Fillingame, R. H.** (1998). Interacting helical faces of subunits a and c in the F_1F_0 ATP synthase of *Escherichia coli* defined by disulfide cross-linking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 6607–6612.
- Jiang, W., Hermolin, J., Fillingame, R. H. und Boyer, P. D.** (2001). The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 4966–4971.
- Johnson, A. S., van Horck, S. und Lewis, P. J.** (2004). Dynamic localization of membrane proteins in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 150: 2815–2824.
- Jones, D. T.** (2007). Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics*, 23: 538–544.
- Jones, D. T., Taylor, J. W. R. und Thorntont, J. M.** (1994). A Model Recognition Approach to the Prediction of All-Helical Membrane Protein Structure and Topology. *Biochemistry*, 33: 3038–3049.
- Jones, H. M., Brajkovich, C. M. und Gunsalus, R. P.** (1983). *In vivo* 5' terminus and length of the mRNA for the proton-translocating ATPase (*unc*) operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 155: 1279–1287.
- Jones, P. C., Jiang, W. und Fillingame, R. H.** (1998). Arrangement of the Multicopy H^+ -translocating Subunit c in the Membrane Sector of the *Escherichia coli* F_1F_0 ATP Synthase.

Journal of Biological Chemistry, 273: 17178–17185.

Kaberdin, V. R., Walsh, A. P., Jakobsen, T., Mcdowall, K. J. und Von Gabain, A. (2000). Enhanced Cleavage of RNA Mediated by an Interaction between Substrates and the Arginine-rich Domain of *E. coli* Ribonuclease E. *Journal of Molecular Biology*, 301: 257–264.

Kadonaga, J. T., Gautier, A. E., Straus, D. R., Charles, A. D., Edge, M. D. und Knowles, J. R. (1984). The Role of the beta-Lactamase Signal Sequence in the Secretion of Proteins by *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 2149–2154.

Kadonaga, J. T. und Knowles, J. R. (1985). A simple and efficient method for chemical mutagenesis of DNA. *Nucleic Acids Research*, 13: 1733–1745.

Kadoya, F., Kato, S., Watanabe, K. und Kato-Yamada, Y. (2011). ATP binding to the ϵ subunit of thermophilic ATP synthase is crucial for efficient coupling of ATPase and H^+ pump activities. *The Biochemical Journal*, 437: 135–140.

Kaltwasser, M., Wiegert, T. und Schumann, W. (2002). Construction and application of epitope-and green fluorescent protein-tagging integration vectors for *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2624–2628.

Kanazawa, H., Mabuchi, K. und Futai, M. (1982). Nucleotide Sequence of the Promoter Region of the Gene Cluster for Proton-translocating ATPase from *Escherichia coli* and Identification of the active Promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107: 568–575.

Kanazawa, H., Saito, S. und Futai, M. (1978). Coupling Factor ATPase from *Escherichia coli* An UncA Mutant (*uncA401*) with Defective alpha Subunit. *Journal of Biochemistry*, 84: 1513–1517.

Karimova, G., Dautin, N. und Ladant, D. (2005). Interaction Network among *Escherichia coli* Membrane Proteins Involved in Cell Division as Revealed by Bacterial Two-Hybrid Analysis Interaction Network among *Escherichia coli* Membrane Proteins Involved in Cell Division as Revealed by Bacterial Two-Hybrid. *Journal of Bacteriology*, 187: 2233–2243.

Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. und Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Microbiology*, 95: 5752–5756.

Karimova, G., Robichon, C. und Ladant, D. (2009). Characterization of YmgF, a 72-residue inner membrane protein that associates with the *Escherichia coli* cell division machinery. *Journal of Bacteriology*, 91: 333–346.

Karimova, G., Ullmann, A. und Ladant, D. (2001). Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3: 73–82.

- Kasimoglu, E., Park, S., Malek, J., Tseng, C. P. und Gunsalus, R. P.** (1996). Transcriptional regulation of the proton-translocating ATPase (*atpIBEFHAGDC*) operon of *Escherichia coli*: Control by cell growth rate. *Journal of Bacteriology*, 178: 5563–5567.
- Kato-Yamada, Y., Bald, D., Koike, M., Motohashi, K., Hisabori, T. und Yoshida, M.** (1999). ϵ Subunit, an endogenous Inhibitor of bacterial F_1 -ATPase, also inhibits F_0F_1 -ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 33991–33994.
- Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinoshita, K. und Yoshida, M.** (1998). Direct Observation of the Rotation of ϵ Subunit in F_1 -ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 19375–19377.
- Kato, S., Yoshida, M. und Kato-Yamada, Y.** (2007). Role of the ϵ subunit of thermophilic F_1 -ATPase as a sensor for ATP. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 37618–37623.
- Kato, Y., Matsui, T., Tanaka, N., Muneyuki, E., Hisabori, T. und Yoshida, M.** (1997). Thermophilic F_1 -ATPase Is Activated without Dissociation of an Endogenous Inhibitor, ϵ Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 24906–24912.
- Kersten, M. V., Dunn, S. D., Wise, J. G. und Vogel, P. D.** (2000). Site-Directed Spin-Labeling of the Catalytic Sites Yields Insight into Structural Changes within the F_0F_1 -ATP Synthase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 39: 3856–3860.
- Kinoshita, K., Adachi, K. und Itoh, A.** (2004). Rotation of F_1 -ATPase: How an ATP-Driven Molecular Machine May Work. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33: 245–68.
- Kinoshita Jr, K., Yasuda, R., Noji, H. und Adachi, K.** (2000). A rotary molecular motor that can work at near 100% efficiency. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 355: 473–489.
- Klionsky, D. J., Brusilow, W. S. A. und Simoni, R. D.** (1984). *In vivo* evidence for the role of the ϵ subunit as an inhibitor of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 160: 1055–1060.
- Klionsky, D. J., Skalnik, D. G. und Simoni, R. D.** (1986). Differential Translation of the Genes Encoding the Proton- translocating ATPase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 261(18): 8096–8099.
- Kobayashi, H.** (1985). A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 72–76.
- Kobayashi, H., Suzuki, T. und Unemoto, T.** (1986). Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 627–630.

- Kol, S., Turrell, B. R., De Keyzer, J., van der Laan, M., Nouwen, N. und Driessen, A. J. M.** (2006). YidC-mediated membrane insertion of assembly mutants of subunit c of the F₁F₀ ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 29762–29768.
- Konno, H., Isu, A., Kim, Y., Murakami-Fuse, T., Sugano, Y. und Hisabori, T.** (2011). Characterization of the relationship between ADP- and ϵ -induced inhibition in cyanobacterial F₁-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 13423–13429.
- Koshland, D. und Botstein, D.** (1982). Evidence for posttranslational translocation of beta-lactamase across the bacterial inner membrane. *Cell*, 30: 893–902.
- Koshland, D. E.** (2002). Special essay. The seven pillars of life. *Science*, 295: 2215–2216.
- Koumandou, V. L. und Kossida, S.** (2014). Evolution of the F₀F₁ ATP Synthase Complex in Light of the Patchy Distribution of Different Bioenergetic Pathways across Prokaryotes. *PLoS Computational Biology*, 10. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003821.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop II, R. M. und Peterson, K. M.** (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166: 175–176.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L. L.** (2001). Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305: 567–580.
- Krulwich, T. A., Ito, M., Hicks, D. B., Gilmour, R. und Guffanti, A. A.** (1998). pH homeostasis and ATP synthesis: Studies of two processes that necessitate inward proton translocation in extremely alkaliphilic *Bacillus* species. *Extremophiles*, 2: 217–222.
- Kuhnert, W. L., Zheng, G., Faustoferri, R. C. und Quivey, R. G.** (2004). The F-ATPase operon promoter of *Streptococcus mutans* is transcriptionally regulated in response to external pH. *Journal of Bacteriology*, 186: 8524–8528.
- Kurata, T., Katayama, A., Hiramatsu, M., Kiguchi, Y., Takeuchi, M., Watanabe, T., Ogasawara, H., Ishihama, A. und Yamamoto, K.** (2013). Identification of the set of genes, including nonannotated *morA*, under the direct control of ModE in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 195: 4496–4505.
- Kushner, S. R.** (2002). mRNA Decay in *Escherichia coli* Comes of Age. *Journal of Bacteriology*, 184: 4658–4665.
- van der Laan, M., Bechduft, P., Kol, S., Nouwen, N. und Driessen, A. J. M.** (2004). F₁F₀ ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *Journal of Cell Biology*, 165: 213–222.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.

Laget, P. P. und Smith, J. B. (1979). Inhibitory properties of endogenous subunit ϵ in the *Escherichia coli* F₁ ATPase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 197: 83–89.

Lagoni, O. R., Von Meyenburg, K. und Michelsen, O. (1993). Limited Differential mRNA Inactivation in the *atp (unc)* Operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175: 5791–5797.

Lai, E.-M., Nair, U., Phadke, N. D. und Maddock, J. R. (2004). Proteomic screening and identification of differentially distributed membrane proteins in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 52: 1029–1044.

Langemeyer, L. und Engelbrecht, S. (2007). Essential arginine in subunit a and aspartate in subunit c of F_oF₁ ATP synthase. Effect of repositioning within Helix 4 of subunit a and Helix 2 of subunit c. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767: 998–1005.

Lapunte-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quiros, P. M., Calvo, E., Rodriguez-Hernandez, M. A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, A., Lopez-Otin, C., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., Fernandez-Vizarra, E. und Enriquez, J. A. (2013). Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science*, 340: 1567–1570.

Leroy, A., Vanzo, N. F., Sousa, S., Dreyfus, M. und Carpousis, A. J. (2002). Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: Role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Molecular Microbiology*, 45: 1231–1243.

Li, G. und Young, K. D. (2012). Isolation and identification of new inner membrane-associated proteins that localize to cell poles in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 84: 276–295.

Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N. und Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Research*, 43. doi: 10.1093/nar/gkv279.

Linsinger, G., Wilhelm, S., Wagner, H. und Hacker, G. (1999). Uncouplers of Oxidative Phosphorylation Can Enhance a Fas Death Signal. *Molecular and Cellular Biology*, 19: 3299–3311.

Liu, J., Hicks, D. B. und Krulwich, T. A. (2013). Roles of AtpI and two YidC-type proteins from alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 in ATP synthase assembly and nonfermentative growth. *Journal of Bacteriology*, 195: 220–230.

Llorente-Garcia, I., Lenn, T., Erhardt, H., Harriman, O. L., Liu, L. N., Robson, A.,

- Chiu, S. W., Matthews, S., Willis, N. J., Bray, C. D., Lee, S. H., Shin, J. Y., Bustamante, C., Liphardt, J., Friedrich, T., Mullineaux, C. W. und Leake, M. C.** (2014). Single-molecule *in vivo* imaging of bacterial respiratory complexes indicates delocalized oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837: 811–824.
- Long, J. C., Wang, S. und Vik, S. B.** (1998). Membrane Topology of Subunit a of the F₁F₀ ATP Synthase as Determined by Labeling of Unique Cysteine Residues. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 16235–16240.
- Lopez, P. J., Marchand, I., Joyce, S. A. und Dreyfus, M.** (1999). The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*. *Molecular Microbiology*, 33: 188–199.
- Lu, P., Lill, H. und Bald, D.** (2014). ATP synthase in mycobacteria: Special features and implications for a function as drug target. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837: 1208–1218.
- Lukjancenko, O., Wassenaar, T. M. und Ussery, D. W.** (2010). Comparison of 61 Sequenced *Escherichia coli* Genomes. *Microbial Ecology*, 60: 708–720.
- Lünsdorf, H., Ehrig, K., Friedl, P. und Schairer, H. U.** (1984). Use of monoclonal antibodies in immuno-electron microscopy for the determination of subunit stoichiometry in oligomeric enzymes. *Journal of Molecular Biology*, 173: 131–136.
- Lycklama a Nijeholt, J. A. und Driessen, A. J. M.** (2012). The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 367: 1016–1028.
- Mabuchi, K., Kanazawa, H., Kayano, T. und Futai, M.** (1981). Nucleotide Sequence of the Gene Coding for the δ subunit of Proton-Translocating ATPase of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 102: 172–179.
- Mackie, G. A.** (2013). RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nature Reviews Microbiology*, 11: 45–57.
- Magalon, A. und Alberge, F.** (2016). Distribution and dynamics of OXPHOS complexes in the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857: 198–213.
- Majorek, K. A., Kuhn, M. L., Chruszcz, M., Anderson, W. F. und Minor, W.** (2014). Double trouble - Buffer selection and his-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. *Protein Science*, 23: 1359–1368.
- Makita, S., Al-Shawafi, H. A., Sultana, S., Sohda, M., Nomura, S. und Oda, K.** (2012). A dimerization defect caused by a glycine substitution at position 420 by serine in tissue-

nonspecific alkaline phosphatase associated with perinatal hypophosphatasia. *FEBS Journal*, 279: 4327–4337.

Manoil, C. (1990). Analysis of Protein Localization by Use of Gene Fusions with Complementary Properties. *Journal of Bacteriology*, 172: 1035–1042.

Manoil, C. (1991). Analysis of Membrane Protein Topology Using Alkaline Phosphatase and β -Galactosidase Gene Fusions. *Methods in Cell Biology*, 34: 61–75.

Manoil, C. und Beckwith, J. (1985). *TnphoA*: A transposon probe for protein export signals. *Genetics*, 82: 8129–8133.

Manoil, C. und Beckwith, J. (1986). A Genetic Approach to Analyzing Membrane Protein Topology. *Science*, 233: 1403–1408.

Martín-Galiano, A. J., Ferrándiz, M. J. und De la Campa, A. G. (2001). The promoter of the operon encoding the F_0F_1 ATPase of *Streptococcus pneumoniae* is inducible by pH. *Molecular Microbiology*, 41: 1327–1338.

Masaïke, T., Muneyuki, E., Noji, H., Kinoshita Jr., K. und Yoshida, M. (2002). F_1 -ATPase changes its conformations upon phosphate release. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 21643–21649.

Massé, E., Escorcía, F. E. und Gottesman, S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes and Development*, 17: 2374–2383.

Matten, S. R., Schneider, T. D., Ringquist, S. und Brusilow, W. S. A. (1998). Identification of an intragenic ribosome binding site that affects expression of the *uncB* gene of the *Escherichia coli* proton-translocating ATPase (*unc*) operon. *Journal of Bacteriology*, 180: 3940–3945.

Matthies, D., Haberstock, S., Joos, F., Dötsch, V., Vonck, J., Bernhard, F. und Meier, T. (2011). Cell-Free Expression and Assembly of ATP Synthase. *Journal of Molecular Biology*, 413: 593–603.

Matthies, D., Preiss, L., Klyszejko, A. L., Müller, D. J., Cook, G. M., Vonck, J. und Meier, T. (2009). The c13 Ring from a Thermoalkaliphilic ATP Synthase Reveals an Extended Diameter Due to a Special Structural Region. *Journal of Molecular Biology*, 388: 611–618.

Maurer, L. M., Yohannes, E., Bondurant, S. S., Radmacher, M. und Slonczewski, J. L. (2005). pH Regulates Genes for Flagellar Motility, Catabolism, and Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 187: 304–319.

Maxson, M. E. und Darwin, A. J. (2006). PspB and PspC of *Yersinia enterocolitica* are dual

- function proteins: Regulators and effectors of the phage-shock-protein response. *Molecular Microbiology*, 59: 1610–1623.
- McCarthy, J. E. G.** (1988). Expression of the *unc* genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 20: 19–39.
- McCarthy, J. E. G. und Bokelmann, C.** (1988). Determinants of translational initiation efficiency in the *atp* operon of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2: 455–465.
- McCarthy, J. E. G.** (1990). Post-transcriptional control in the polycistronic operon environment: Studies of the *atp* operon of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 4: 1233–1240.
- McCarthy, J. E. G., Gerstel, B., Surin, B., Wiedemann, U. und Ziemke, P.** (1991). Differential gene expression from the *Escherichia coli atp* operon mediated by segmental differences in mRNA stability. *Molecular Microbiology*, 5: 2447–2458.
- McCarthy, J. E. G., Schairer, H. U. und Sebald, W.** (1985). Translational initiation frequency of *atp* genes from *Escherichia coli*: identification of an intercistronic sequence that enhances translation. *The EMBO Journal*, 4: 519–526.
- McLaughlin, S.** (1972). The mechanism of action of DNP on phospholipid bilayer membranes. *Journal of Membrane Biology*, 9: 361–372.
- McMillan, D. G. G., Keis, S., Dimroth, P. und Cook, G. M.** (2007). A specific adaptation in the a subunit of thermoalkaliphilic F₁F₀-ATP synthase enables ATP synthesis at high pH but not at neutral pH values. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 17395–404.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A. P. und Lopez, R.** (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research*, 41: W597–W600.
- Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W. und Dimroth, P.** (2005). Structure of the rotor ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science*, 308: 659–662.
- Meléndez-Hevia, E., Waddell, T. G. und Cascante, M.** (1996). The Puzzle of the Krebs Citric Acid Cycle: Assembling the Pieces of Chemically Feasible Reactions, and Opportunism in the Design of Metabolic Pathways During Evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 293–303.
- Mergeay, M., Houba, C. und Gerits, J.** (1978). Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas*. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 86: 440–441.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P. und Van Gijsegem, F.** (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound

resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, 162: 328–334.

Von Meyenburg, K., Jorgensen, B. B. und van Deurst, B. (1984). Physiological and morphological effects of overproduction of membrane-bound ATP synthase in *Escherichia coli* K-12. *The EMBO Journal*, 3: 1791–1797.

Von Meyenburg, K., Jorgensen, B. B., Michelsen, O., Sorensen, L. und Mccarthy, J. E. G. (1985). Proton conduction by subunit a of the membrane-bound ATP synthase of *Escherichia coli* revealed after induced overproduction. *The EMBO Journal*, 4: 2357–2363.

Von Meyenburg, K., Jorgensen, B. B., Nielsen, J. und Hansen, F. G. (1982). Promoters of the *atp* Operon Coding for the Membrane-Bound ATP Synthase of *Escherichia coli* Mapped by Tn10 Insertion Mutations. *Molecular and General Genetics*, 188: 240–248.

Michaelis, S., Inouye, H., Oliver, D. und Beckwith, J. (1983). Mutations That Alter the Signal Sequence of Alkaline Phosphatase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 154: 366–374.

Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Edited by J. H. Miller. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Edited by J. H. Miller. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Miller, M. J., Oldenburg, M. und Fillingame, R. H. (1990). The essential carboxyl group in subunit c of the F₁F₀ ATP synthase can be moved and H⁺-translocating function retained. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 4900–4904.

Misra, T. K. und Apirion, D. (1979). RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 254: 11154–11159.

Mitaku, S. und Hirokawa, T. (1999). Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: hydrophobicity of helical segments and protein length. *Protein Engineering*, 12: 953–957.

Mitaku, S., Hirokawa, T. und Tsuji, T. (2002). Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane–water interfaces. *Bioinformatics*, 18: 608–616.

Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 41: 445–502.

Monticello, R. A., Angov, E. und Brusilow, W. S. A. (1992). Effects of inducing expression of cloned genes for the F₀ proton channel of the *Escherichia coli* F₁F₀ ATPase. *Journal of Bacteriology*, 174: 3370–3376.

- Morales-Rios, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., Walker, J. E., Dunn, S. D., Fillingame, R. H. und Wigley, D.** (2015). Structure of ATP synthase from *Paracoccus denitrificans* determined by X-ray crystallography at 4.0 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 13231–13236.
- Morita, T., Maki, K. und Aiba, H.** (2005). RNase E-based ribonucleoprotein complexes: Mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes and Development*, 19: 2176–2186.
- Mosteller, R. D. und Goldstein, R. V** (1975). Unusual sensitivity of *Escherichia coli* to adenine or adenine plus histidine. *Journal of Bacteriology*, 123: 750–751.
- Nielsen, J., Jorgensen, B. B., von Meyenburg, K. und Hansen, F. G.** (1984). The Promoters of the *atp* Operon of *Escherichia coli* K12. *Molecular and General Genetics*, 193: 64–71.
- Nishizaka, T., Oiwa, K., Noji, H., Kimura, S., Muneyuki, E., Yoshida, M. und Kinoshita, K. J.** (2004). Chemomechanical coupling in F₁-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11: 142–148.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. und Kinoshita Jr., K.** (1997). Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature*, 386: 299–302.
- Nugent, T. und Jones, D. T.** (2009). Transmembrane protein topology prediction using support vector machines. *BMC Bioinformatics*, 10. doi: 10.1186/1471-2105-10-159.
- Okazaki, K.-I. und Hummer, G.** (2015). Elasticity, friction, and pathway of γ -subunit rotation in F_oF₁-ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 10720–10725.
- Oliver, D. und Beckwith, J.** (1981). *E. coli* Mutant Pleiotropically Defective in the Export of Secreted Proteins. *Cell*, 25: 765–772.
- Ozaki, Y., Suzuki, T., Kuruma, Y., Ueda, T. und Yoshida, M.** (2008). UncI protein can mediate ring-assembly of c-subunits of F_oF₁-ATP synthase *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367: 663–666.
- Padan, E., Arbel, T., Rimon, A., Shira, A. B. und Cohen, A.** (1983). Biosynthesis of the lactose permease in *Escherichia coli* minicells and effect of carrier amplification on cell physiology. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 5666–5673.
- Panek, A., Pietrow, O., Filipkowski, P. und Synowiecki, J.** (2013). Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. *Acta Biochimica Polonica*, 60: 163–166.
- Passian, N.** (2014). Die physiologische Rolle von AtpI in *Escherichia coli*. MLU Halle-

Wittenberg.

Patel, A. M. und Dunn, S. D. (1992). RNase E-dependent cleavages in the 5' and 3' regions of the *Escherichia coli unc* mRNA. *Journal of Bacteriology*, 174: 3541–3548.

Patel, A. M. und Dunn, S. D. (1995). Degradation of the *Escherichia coli uncB* mRNA by multiple endonucleolytic cleavage. *Journal of Bacteriology*, 177: 3917–3922.

Pati, S., Disilvestre, D. und Brusjiow, W. S. A. (1992). Regulation of the *Escherichia coli uncH* gene by mRNA secondary structure and translational coupling. *Molecular Microbiology*, 6: 3559–3566.

Pédelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. und Waldo, G. S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 24: 79–88.

Pfennig, N. (1974). *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n., a new species of the *Rhodospirillaceae*. *Archives of Microbiology*, 100: 197–206.

Pollitt, S. und Zalkin, H. (1983). Role of Primary Structure and Disulfide Bond Formation in Beta- Lactamase Secretion. *Journal of Bacteriology*, 153: 27–32.

Porter, A. C. G., Brusilow, W. S. A. und Simoni, R. D. (1983). Promoter for the *unc* operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 155: 1271–1278.

Pribyl, T. (2001). Topologie des CzcCBA-Efflux-Komplexes aus *Ralstonia metallidurans* CH34. MLU Halle-Wittenberg.

Price, C. E. und Driessen, A. J. M. (2010). Biogenesis of membrane bound respiratory complexes in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1803: 748–766.

Py, B., Higgins, C. F., Krisch, H. M. und Carpousis, A. J. (1996). A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature*, 381: 169–172.

Reddy, P., Peterkofsky, A. und Mckenneyt, K. (1985). Translational efficiency of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene: Mutating the UUG initiation codon to GUG or AUG results in increased gene expression. *Biochemistry*, 82: 5656–5660.

Rich, P. R. (2003). The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. An historical perspective. *Biochemical Society Transactions*, 31: 1095–1105.

Rodgers, A. J. W. und Capaldi, R. A. (1998). The Second Stalk Composed of the b- and δ -subunits Connects F_0 to F_1 via an α -Subunit in the *Escherichia coli* ATP Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 29406–29410.

Rodgers, A. J. W., Wilkens, S., Aggeler, R., Morris, M. B., Howitt, S. M. und Capaldi, R. A. (1997). The Subunit δ -Subunit b Domain of the *Escherichia coli* F_1F_0 ATPase. *The*

Journal of Biological Chemistry, 272: 31058–31064.

Romano, A. H. und Conway, T. (1996). Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Research in Microbiology*, 147: 448–455.

von Rozycki, T. und Nies, D. H. (2009). *Cupriavidus metallidurans*: Evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96: 115–139.

Rühle, T., Razeghi, J. A., Vamvaka, E., Viola, S., Gandini, C., Kleine, T., Schünemann, D., Barbato, R., Jahns, P. und Leister, D. (2014). The *Arabidopsis* protein conserved only in the green lineage160 promotes the assembly of the membranous part of the chloroplast ATP synthase. *Plant Physiology*, 165: 207–26.

Sakai-Tomita, Y., Moritani, C., Kanazawa, H., Tsuda, M. und Tsuchiya, T. (1992). Catabolite repression of the H⁺-translocating ATPase in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 174: 6743–6751.

Saraste, M., Gay, N. J., Eberle, A., Runswick, M. J. und Walker, J. E. (1981). The *atp* operon: nucleotide sequence of the genes for the γ , β , and ϵ subunits of *Escherichia coli* ATP synthase. *Nucleic Acids Research*, 9: 5287–5296.

Saraste, M., Sibbald, P. R. und Wittinghofer, A. (1990). The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 15: 430–434.

Sasaki, Y., Nogami, E., Maeda, M., Nakanishi-Matsui, M. und Iwamoto-Kihara, A. (2014). A unique F-type H⁺-ATPase from *Streptococcus mutans*: An active H⁺ pump at acidic pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443: 677–682.

Scanlon, J. A. B., Al-Shawi, M. K., Nga, P. Le und Nakamoto, R. K. (2007). Determination of the partial reactions of rotational catalysis in F₁-ATPase. *Biochemistry*, 46: 8785–8797.

Schaefer, E. M., Hartz, D., Gold, L., Simoni, R. D. und Simonil, R. D. (1989). Ribosome-binding sites and RNA-processing sites in the transcript of the *Escherichia coli unc* operon. *Journal of Bacteriology*, 171: 3901–3908.

Schägger, H. und Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19: 1777–1783.

Scherer, J. und Nies, D. H. (2009). CzcP is a novel efflux system contributing to transition metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Molecular Microbiology*, 73: 601–621.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. und Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9: 676–682.

- Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C. und Eliceiri, K. W.** (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 82: 518–529.
- Schneider, E. und Altendorf, K.** (1982). ATP Synthetase F_1F_0 of *Escherichia coli* K-12 High-Yield Preparation of Functional F_0 by Hydrophobic Affinity Chromatography. *European Journal of Biochemistry*, 126: 149–153.
- Schneider, E. und Altendorf, K.** (1984). Subunit b of the membrane moiety (F_0) of ATPsynthase (F_1F_0) from *Escherichia coli* is indispensable for H^+ -translocation and binding of the water-soluble F_1 moiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 7279–7283.
- Schneider, E. und Altendorf, K.** (1987). Bacterial Adenosine 5'-Triphosphate Synthase (F_1F_0): Purification and Reconstitution of F_0 Complexes and Biochemical and Functional Characterization of Their Subunits. *Microbiological Reviews*, 51: 477–497.
- Schneider, E. und Hunke, S.** (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEBS Letters*, 22: 1–20.
- Schneppe, B., Deckers-Hebestreit, G. und Altendorf, K.** (1990). Overproduction and Purification of the *uncI* Gene Product of the ATP Synthase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 369–395.
- Schneppe, B., Deckers-Hebestreit, G. und Altendorf, K.** (1991). Detection and localization of the *i* protein in *Escherichia coli* cells using antibodies. *FEBS Letters*, 292: 145–147.
- Schramm, H. C., Schneppe, B., Birkenhäger, R. und McCarthy, J. E. G.** (1996). The promoter-proximal, unstable IB region of the *atp* mRNA of *Escherichia coli*: An independently degraded region that can act as a destabilizing element. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1307: 162–170.
- Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N. A., Engel, A., Stahlberg, H. und Müller, D. J.** (2000). Structural biology: Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature*, 405: 418–419.
- Senior, A. E., Downie, J. A., Cox, G. B., Gibson, F., Langman, L. und Faylet, D. R. H.** (1979). The *uncA* Gene Codes for the α -Subunit of the Adenosine Triphosphatase of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 180: 103–109.
- Senior, A. E., Fayle, D. R., Downie, J. A., Gibson, F. und Cox, G. B.** (1979). Properties of membranes from mutant strains of *Escherichia coli* in which the beta-subunit of the adenosine triphosphatase is abnormal. *Biochemical Journal*, 180: 111–118.
- Shimabukuro, K., Yasuda, R., Muneyuki, E., Hara, K. Y., Kinoshita, K., Yoshida, M. und**

- Boyer, P. D.** (2003). Catalysis and rotation of F_1 motor: Cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40° substep rotation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 14731–14736.
- Shu, X., Shaner, N. C., Yarbrough, C. A., Tsien, R. Y. und Remington, S. J.** (2006). Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry*, 45: 9639–9647.
- Sieben, M., Steinhorn, G., Müller, C., Fuchs, S., Ann Chin, L., Regestein, L. und Büchs, J.** (2016). Testing plasmid stability of *Escherichia coli* using the Continuously Operated Shaken BIOreactor System. *Biotechnology Progress*, 32: 1418–1425.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Sö Ding, J., Thompson, J. D. und Higgins, D. G.** (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7. doi: 10.1038/msb.2011.75.
- Silhavy, T. J., Shuman, H. A., Beckwith, J. und Schwartz, M.** (1977). Use of gene fusions to study outer membrane protein localization in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 74: 5411–5415.
- Simon, R.** (1984). High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. *Molecular and General Genetics*, 196: 413–20.
- Simons, R. W., Houman, F. und Kleckner, N.** (1987). Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, 53: 85–96.
- Singh, R., Rathore, Y. S., Singh, N. S., Peddada, N., Ashish und Raychaudhuri, S.** (2013). Substitution of Glutamate Residue by Lysine in the Dimerization Domain Affects DNA Binding Ability of HapR by Inducing Structural Deformity in the DNA Binding Domain. *PLoS ONE*, 8: e76033.
- Singh, S., Turina, P., Bustamante, C. J., Keller, D. J. und Capaldi, R.** (1996). Topographical structure of membrane-bound *Escherichia coli* F_1F_0 ATP synthase in aqueous buffer. *FEBS Letters*, 397: 30–34.
- Sinha, S., Lopes, D. H. J. und Bitan, G.** (2012). A key role for lysine residues in amyloid beta-protein folding, assembly, and toxicity. *ACS Chemical Neuroscience*, 3: 473–481.
- Sinz, A., Arlt, C., Chorev, D. und Sharon, M.** (2015). Chemical cross-linking and native mass spectrometry: A fruitful combination for structural biology. *Protein Science*, 24: 1193–1209.
- Snyder, W. B. und Silhavy, T. J.** (1995). β -Galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. *Journal of*

Bacteriology, 177: 953–963.

Solomon, K. A., Hsu, D. K. W. und Brusilow, W. S. A. (1989). Use of *lacZ* Fusions To Measure *In Vivo* Expression of the First Three Genes of the *Escherichia coli unc* Operon. *Journal of Bacteriology*, 171: 3039–3045.

Sone, N., Sekimachi, M. und Kutoh, E. (1987). Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed of a *bc₁* complex and cytochrome oxidase in the thermophilic bacterium PS3. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 15386–15391.

Sonnhammer, E. L. L., Von Heijne, G. und Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. in Glasgow, J., Littlejohn, T., Major, F., Lathrop, R., Sankoff, D., and Sensen, C. (eds) *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. Menlo Park: AAAI Press, 175–182.

Sorgen, P. L., Bubb, M. R., McCormick, K. A., Edison, A. S. und Cain, B. D. (1998). Formation of the b subunit dimer is necessary for interaction with F₁-ATPase. *Biochemistry*, 37: 923–932.

Sousa, P. M. F., Videira, M. A. M. und Melo, A. M. P. (2013a). The formate: Oxygen oxidoreductase supercomplex of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *FEBS Letters*, 587: 2559–2564.

Sousa, P. M. F., Videira, M. A. M., Santos, F. A. S., Hood, B. L., Conrads, T. P. und Melo, A. M. P. (2013b). The *bc:caa₃* supercomplexes from the Gram positive bacterium *Bacillus subtilis* respiratory chain: A megacomplex organization? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 537: 153–160.

Spratt, B. G. (1983). Penicillin-binding Proteins and the Future of Beta-Lactam Antibiotics. *Journal of General Microbiology*, 129: 1247–1260.

Stahlberg, H., Müller, D. J., Suda, K., Fotiadis, D., Engel, A., Meier, T., Matthey, U. und Dimroth, P. (2001). Bacterial Na⁺-ATP synthase has an undecameric rotor. *EMBO Reports*, 2: 229–233.

Steffens, K., Schneider, E., Deckers-hebestreit, G. und Altendorf, K. (1987). F_o Portion of *Escherichia coli* ATP Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(12): 5866–5869.

Stock, D., Leslie, A. G. W. und Walker, J. E. (1999). Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase. *Science*, 286: 1700–1705.

Sugiyama, J. E., Mahmoodian, S. und Jacobson, G. R. (1991). Membrane topology analysis of *Escherichia coli* mannitol permease by using a nested-deletion method to create *mtlA-phoA* fusions. *Biochemistry*, 88: 9603–9607.

Suzuki, T., Ozaki, Y., Sone, N., Feniouk, B. A. und Yoshida, M. (2007). The product of

- uncI gene in F_1F_0 -ATP synthase operon plays a chaperone-like role to assist c-ring assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 20776–20781.
- Tabor, S. und Richardson, C. C.** (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 1074–1078.
- Tadayyon, M., Zhang, Y., Gnaneshan, S., Hunt, L., Mehraein-Ghomi, F. und Broome-Smith, J. K.** (1992). Beta-Lactamase fusion analysis of membrane protein assembly. *Biochemical Society Transactions*, 20: 598–601.
- Takeyasu, K., Omote, H., Nettikadan, S., Tokumasu, F., Iwamoto-Kihara, A. und Futai, M.** (1996). Molecular imaging of *Escherichia coli* F_0F_1 -ATPase in reconstituted membranes using atomic force microscopy. *FEBS Letters*, 392: 110–113.
- Tommassen, J., Leunissen, J., Van Damme-Jongsten, M., Overduin, P. und Simons, K.** (1985). Failure of *E. coli* K-12 to transport PhoE-LacZ hybrid proteins out of the cytoplasm. *The EMBO Journal*, 4: 1041–1047.
- Towbin, H., Staehelint, T. und Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 4350–4354.
- Tusnády, G. E. und Simon, I.** (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *Journal of Molecular Biology*, 283: 489–506.
- Tusnády, G. E. und Simon, I.** (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, 17: 849–850.
- Uhlin, U., Cox, G. B. und Guss, J. M.** (1997). Crystal structure of the ϵ subunit of the proton-translocating ATP synthase from *Escherichia coli*. *Structure*, 5: 1219–1230.
- Uden, G. und Kleefeld, A.** (2004). C4-Dicarboxylate Degradation in Aerobic and Anaerobic Growth. *EcoSal Plus*, 1. doi: 10.1128/ecosalplus.3.4.5.
- Valiyaveetil, F. I. und Fillingame, R. H.** (1997). On the Role of Arg-210 and Glu-219 of Subunit a in Proton Translocation by the *Escherichia coli* F_0F_1 -ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 32635–32641.
- Valiyaveetil, F. I. und Fillingame, R. H.** (1998). Transmembrane Topography of Subunit a in the *Escherichia coli* F_1F_0 ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 16241–16247.
- Vogel, J. und Luisi, B. F.** (2011). Hfq and its constellation of RNA. *Nature Review Microbiology*, 9: 578–589.

- Wada, T., Long, J. C., Zhang, D. und Vik, S. B.** (1999). A Novel Labeling Approach Supports the Five-transmembrane Model of Subunit a of the *Escherichia coli* ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 17353–17357.
- Walker, J. E.** (2012). The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 41: 1–16.
- Walker, J. E., Fearnley, I. M., Gay, N. J., Gibson, B. W., Northrop, F. D., Powell, S. J., Runswick, M. J., Saraste, M. und Tybulewicz, V. L. J.** (1985). Primary structure and subunit stoichiometry of F₁-ATPase from bovine mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, 184: 677–701.
- Walker, J. E., Gay, N. J., Saraste, M. und Eberle, A. N.** (1984a). DNA sequence around the *Escherichia coli unc* operon Completion of the sequence of a 17 kilobase segment containing *asnA*, *oriC*, *unc*, *gimS* and *phoS*. *Biochemical Journal*, 224: 799–815.
- Walker, J. E., Saraste, M. und Gay, N. J.** (1984b). The UNC operon nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 768: 164–200.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. und Gay, N. J.** (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*, 1: 945–951.
- Walsh, M. A., Otwinowski, Z., Perrakis, A., Anderson, P. M. und Joachimiak, A.** (2000). Structure of cyanase reveals that a novel dimeric and decameric arrangement of subunits is required for formation of the enzyme active site. *Structure*, 8: 505–514.
- Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G. W. und Walker, J. E.** (2010). Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 16823–16827.
- Weaver, E. A., Wyckoff, E. E., Mey, A. R., Morrison, R. und Payne, S. M.** (2013). FeoA and FeoC are essential components of the *Vibrio cholerae* ferrous iron uptake system, and FeoC interacts with FeoB. *Journal of Bacteriology*, 195: 4826–4835.
- Weber, K. und Osborn, M.** (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 244: 4406–4412.
- Weiner, L. und Modelt, P.** (1994). Role of an *Escherichia coli* stress-response operon in stationary-phase survival. *Microbiology*, 91: 2191–2195.
- Wiesemann, N., Mohr, J., Grosse, C., Herzberg, M., Hause, G., Reith, F. und Nies, D. H.** (2013). Influence of copper resistance determinants on gold transformation by *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Journal of Bacteriology*, 195: 2298–2308.

- Wilharm, G., Lehmann, V., Krauss, K., Lehnert, B., Richter, S., Ruckdeschel, K., Heesemann, J., Trülsch, K. und Tru, K.** (2004). *Yersinia enterocolitica* Type III Secretion Depends on the Proton Motive Force but Not on the Flagellar Motor Components MotA and MotB. *Infection and Immunity*, 72: 4004–4009.
- Wilkens, S. and Capaldi, R. A.** (1998). ATP synthase's second stalk comes into focus. *Nature*, 393: 29.
- Wilkens, S., Dahlquist, F. W., McIntosh, L. P., Donaldson, L. W. und Capaldi, R. A.** (1995). Structural features of the epsilon subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase determined by NMR spectroscopy. *Nature*, 2: 961–967.
- Winteler, H. V, Schneidinger, B., Jaeger, K. E. und Haas, D.** (1996). Anaerobically controlled expression system derived from the arcDABC operon of *Pseudomonas aeruginosa*: application to lipase production. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3391–3398.
- Witan, J., Bauer, J., Wittig, I., Steinmetz, P. A., Erker, W. und Unden, G.** (2012). Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: Presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Molecular Microbiology*, 85: 846–861.
- Wu, X., Wu, D., Lu, Z., Chen, W., Hu, X. und Ding, Y.** (2009). A novel method for high-level production of TEV protease by superfolder GFP tag. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009. doi: 10.1155/2009/591923.
- Yagi, H., Kajiwara, N., Tanaka, H., Tsukihara, T., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., Akutsu, H. und Boyer, P. D.** (2007). Structures of the thermophilic F₁-ATPase ϵ subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F₁. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 11233–11238.
- Yasuda, R., Noji, H., Kinoshita, K. und Yoshida, M.** (1998). F₁-ATPase Is a Highly Efficient Molecular Motor that Rotates with Discrete 120° Steps. *Cell*, 93: 1117–1124.
- Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinoshita Jr, K. und Itoh, H.** (2001). Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase. *Nature*, 410: 898–904.
- Yi, L., Celebi, N., Chen, M. und Dalbey, R. E.** (2004). Sec/SRP requirements and energetics of membrane insertion of subunits a, b, and c of the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 39260–39267.
- Yi, L., Jiang, F., Chen, M., Cain, B., Bolhuis, A. und Dalbey, R. E.** (2003). YidC is strictly required for membrane insertion of subunits a and c of the F₁F₀ATP synthase and SecE of the SecYEG translocase. *Biochemistry*, 42: 10537–10544.
- Yoshida, M., Muneyuki, E. und Hisabori, T.** (2001). ATP synthase—a marvellous rotary

engine of the cell. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 2: 669–677.

Zhang, Y. und Fillingame, R. H. (1995). Subunits Coupling H⁺ Transport and ATP Synthesis in the *Escherichia coli* ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 24609–24614.

Zhang, Y., Oldenburg, M. und Fillingame, R. H. (1994). Suppressor Mutations in F₁ Subunit ε Recouple ATP-driven H⁺ Translocation in Uncoupled Q42E Subunit c Mutant of *Escherichia coli* F₁F₀ATP Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 10221–10224.

Zheng, L., Baumann, U. und Reymond, J.-L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research*, 32: e115.

Zipser, D. (1963). A Study of the Urea-produced Subunits of beta-Galactosidase. *Journal of Molecular Biology*, 7: 113–121.

7 Anhang

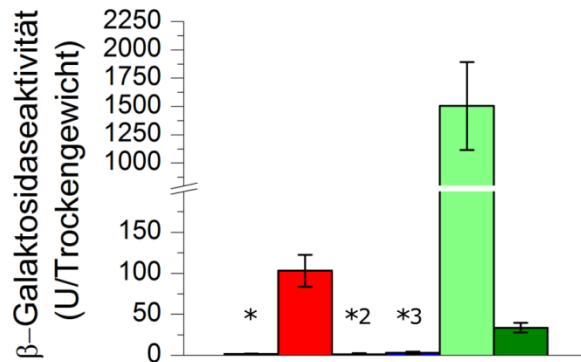


Abb. A 1: Der vorhergesagte Promotor im intergenischen Bereich von *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}*.

Die β-Galaktosidase-Aktivitäten von *lacZ* unter Kontrolle keines Promotors (*grau) und der translationalen Reporterfusionen von *atpI3_{Cmet}'-lacZ* (rot), *atpB3_{Cmet}'-lacZ* (*²hellblau) und *atpE3_{Cmet}'-lacZ* (hellgrün) unter Kontrolle des *atpIp_{Cmet}* sowie *atpB3_{Cmet}'-lacZ* (*³blau) und *atpE3_{Cmet}'-lacZ* (grün) unter Kontrolle des intergenischen Bereichs zwischen *atpI_{Cmet}* und *atpB_{Cmet}*. Die *C. metallidurans* AE104-Stämme mit den Plasmiden pECD1556, pECD1578 oder pECD1581-pECD1584 wurden in TMM_{NaGluc} pH 7,0 angezogen und bei OD₆₀₀ 0,6±0,1 für die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivitäten geerntet.

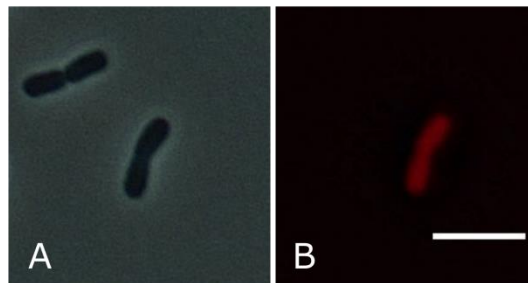


Abb. A 2: Die Lokalisation von AtpB'-mCherry innerhalb der Zelle.

BW25113 mit pECD1591 wurde bei 37 °C schüttelnd in LB-Medium angezogen. 26 h nach Animpfen der Hauptkultur wurden die Zellen auf einen mit 1 % Agarose überzogenen Objektträger getropft und mit dem Ölimmersionsobjektiv (100x/ 1,30) bei Phasenkontrast 3 des Axikop (Zeiss) eine lichtmikroskopische Aufnahme gemacht (A). Das Fluoreszenzbild (B) entstand mit zugeschalteter Fluoreszenzlampe mit dem Filter II. Über das Fluoreszenzbild wurde mit dem Programm Fiji (Schindelin *et al.*, 2012, 2015) der Filter *Unsharp Mask* (Radius=20) gelegt, damit die Objekte besser sichtbar sind. Der weiße Balken rechts unten im Bild entspricht 5 µm Länge.

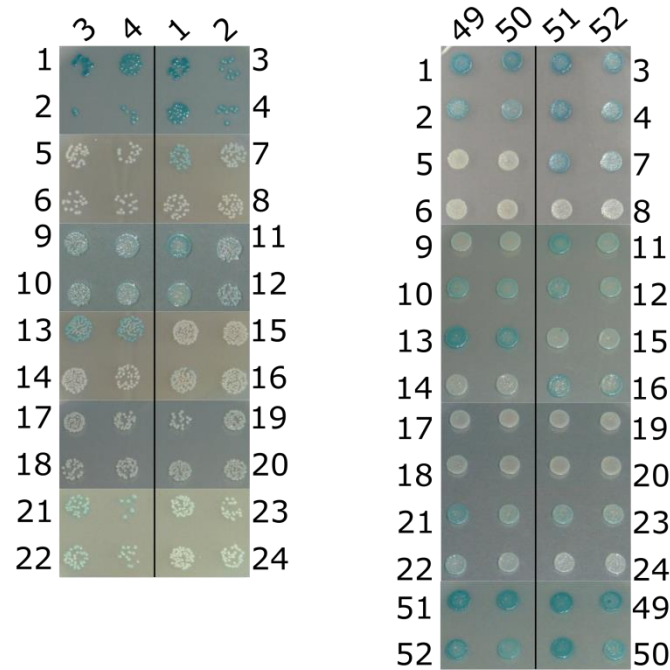


Abb. A 3: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen des Wildtyp-AtpI_{Eco} und AtpI_{Eco}^{V88G}.

Die Transformanten mit den verschiedenen Kombinationen an BACTH-Plasmiden wurden zunächst auf X-Gal haltige LB-Agarplatten getropft und die Färbung der Zellen nach 40stündiger Inkubation bei 30 °C dokumentiert. Die Zahlen stehen für die Proteine, die in den Zellen dieser Reihe synthetisiert wurden: T25'-AtpI_{Eco} (1), AtpI_{Eco}'-T25 (2), AtpI_{Eco}'-T18 (3), T18'-AtpI_{Eco} (4), T25'-AtpB_{Eco} (5), AtpB_{Eco}'-T25 (6), AtpB_{Eco}'-T18 (7), T18'-AtpB_{Eco} (8), T25'-AtpE_{Eco} (9), AtpE_{Eco}'-T25 (10), AtpE_{Eco}'-T18 (11), T18'-AtpE_{Eco} (12), T25'-AtpF_{Eco} (13), AtpF_{Eco}'-T25 (14), AtpF_{Eco}'-T18 (15), T18'-AtpF_{Eco} (16), T25'-AtpH_{Eco} (17), AtpH_{Eco}'-T25 (18), AtpH_{Eco}'-T18 (19), T18'-AtpH_{Eco} (20), T25'-AtpC_{Eco} (21), AtpC_{Eco}'-T25 (22), AtpC_{Eco}'-T18 (23), T18'-AtpC_{Eco} (24), T25'-AtpI_{Eco}^{V88G} (51), AtpI_{Eco}^{V88G}'-T25 (52), AtpI_{Eco}^{V88G}'-T18 (49), T18'-AtpI_{Eco}^{V88G} (50).

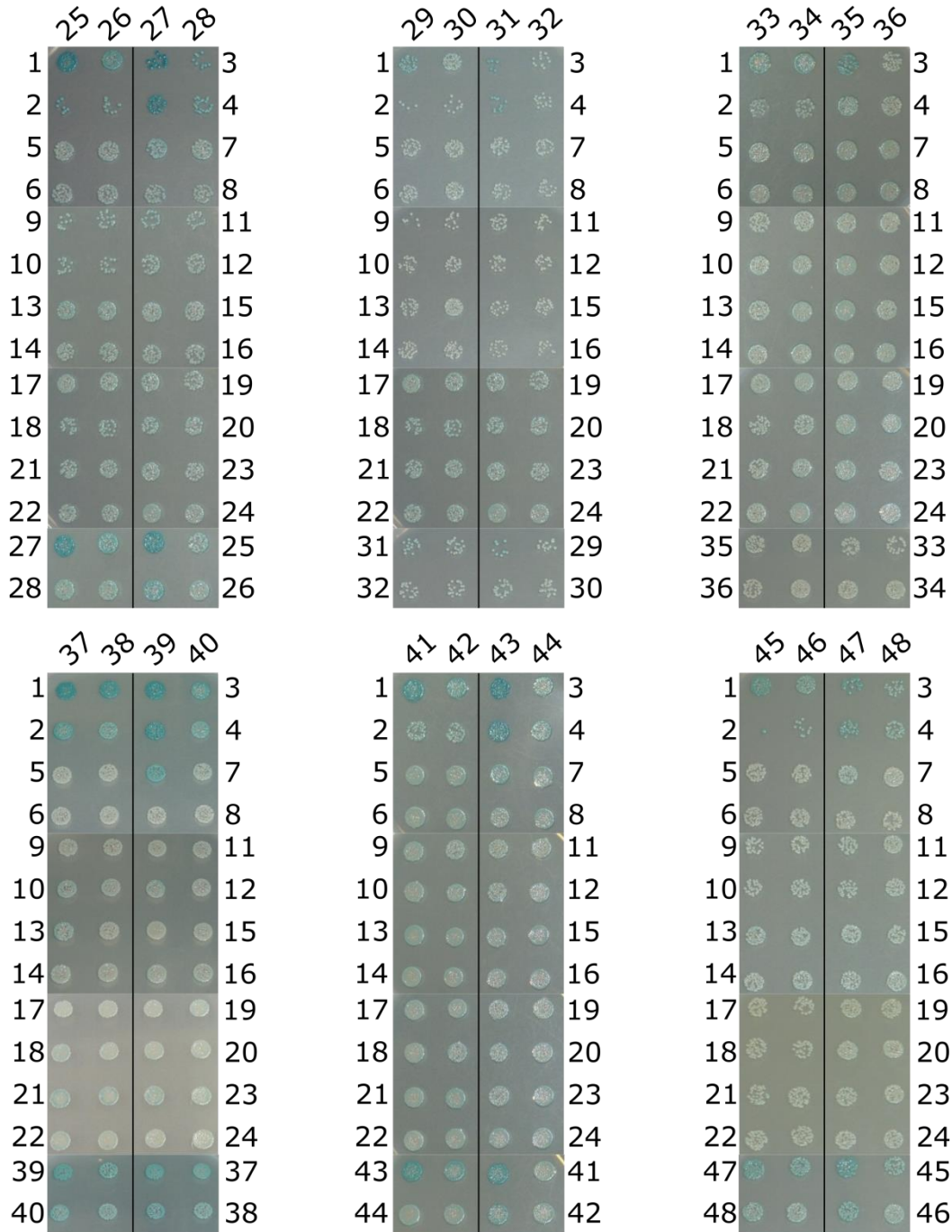


Abb. A 4: Protein-Protein-Interaktionen von AtpI-Mutanten mit Untereinheiten der F_1F_0 -ATPase.

Die Transformanten mit den verschiedenen Kombinationen an BACTH-Plasmiden wurden zunächst auf X-Gal haltige LB-Agarplatten getropft und die Färbung der Zellen nach 40stündiger Inkubation bei 30 °C dokumentiert. Die Zahlen entsprechen der Beschriftung in Abb. A 3: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen des Wildtyp-AtpI_{Eco} und AtpI_{Eco}^{V88G}, sowie den in den Zellen dieser Reihe synthetisierten Proteinen T25-' AtpI_{Eco}^{S39G} (27), AtpI_{Eco}^{S39G}-'T25 (28), AtpI_{Eco}^{S39G}-'T18 (25), T18-' AtpI_{Eco}^{S39G} (26), T25-' AtpI_{Eco}^{S39L} (31), AtpI_{Eco}^{S39L}-'T25 (32), AtpI_{Eco}^{S39L}-'T18 (29), T18-' AtpI_{Eco}^{S39L} (30), T25-' AtpI_{Eco}^{G43V} (35), AtpI_{Eco}^{G43V}-'T25 (36), AtpI_{Eco}^{G43V}-'T18 (33), T18-' AtpI_{Eco}^{G43V} (34), T25-' AtpI_{Eco}^{E79K} (39), AtpI_{Eco}^{E79K}-'T25 (40), AtpI_{Eco}^{E79K}-'T18 (37), T18-' AtpI_{Eco}^{E79K} (38), T25-' AtpI_{Eco}^{K82E} (43), AtpI_{Eco}^{K82E}-'T25 (44), AtpI_{Eco}^{K82E}-'T18 (41), T18-' AtpI_{Eco}^{K82E} (42), T25-' AtpI_{Eco}^{E79K K82E} (47), AtpI_{Eco}^{E79K K82E}-'T25 (48), AtpI_{Eco}^{E79K K82E}-'T18 (45), T18-' AtpI_{Eco}^{E79K K82E} (46).

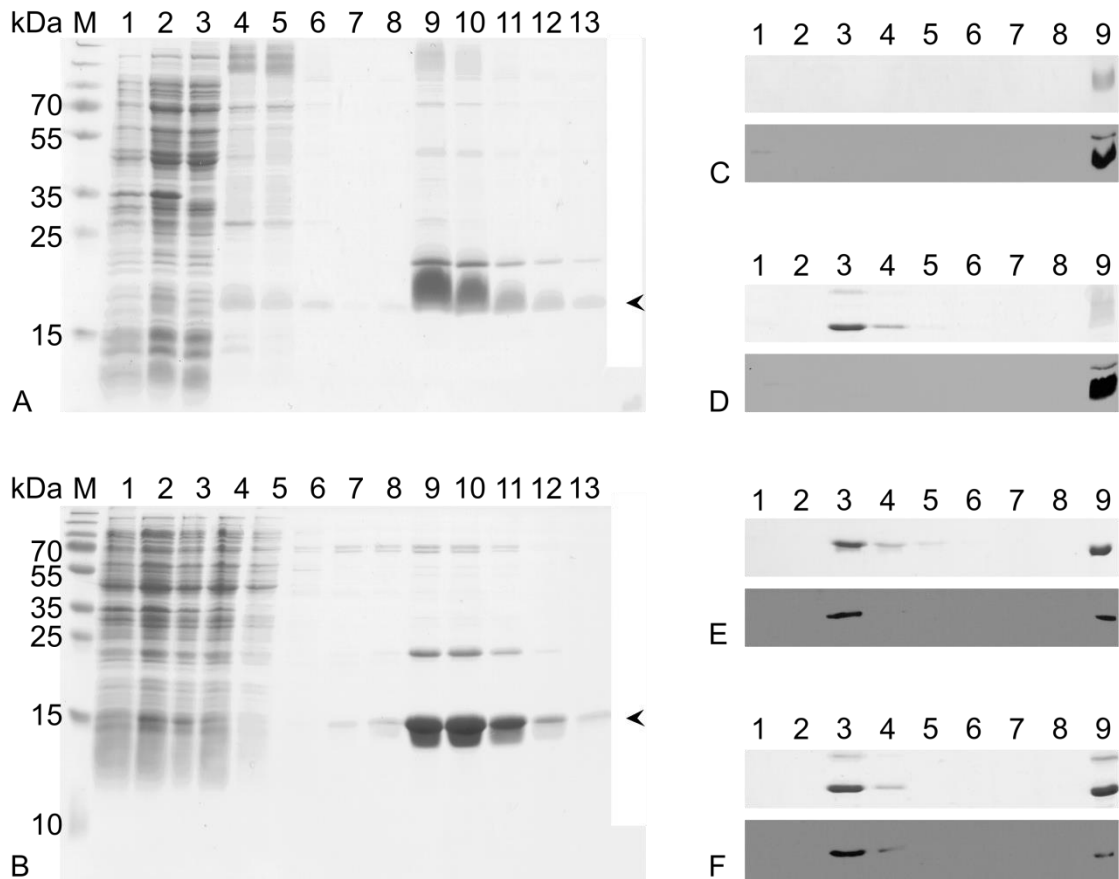


Abb. A 5: Affinitätschromatographie von Strep-AtpI_{Eco} und His-AtpC_{Eco}.

(A, B) Die während der Protein-Reinigung von Strep-AtpI_{Eco} (A) und His-AtpC_{Eco} (B) entnommenen Proben wurden über eine SDS-PAGE getrennt. Als Proteinstandard diente der *Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder* (M) und es folgten Rohzellextrakt vor der Induktion (1), Rohzellextrakt 3 h nach der Induktion (2), Überstand nach Ultrazentrifugation (3), in 1 % DDM gelöstes Pellet (A4), Säulendurchfluss (A5 und B4), Waschfraktionen 3 und 6 (A6-7 und B5-6), Waschfraktion 9 (B7), Elutionsfraktionen 1-6 (8-13). Die Pfeile weisen auf das jeweilige Protein. (C-F) Um zu testen, wie effizient das Waschen während des *Pulldown-Assays* war, wurden die einzelnen Fraktionen (1-8) sowie gereinigtes Protein (9) über eine SDS-PAGE (oben) getrennt und ein Western Blot (unten) mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Während des *Pulldown-Assays* wurde nur Strep-AtpI_{Eco} geladen (C, Strep-AtpI_{Eco} (9)), Strep-AtpI_{Eco} vor dem ersten Waschschrift und His-AtpC_{Eco} nach dem 2. (D-E; Strep-AtpI_{Eco} (D9), His-AtpC_{Eco} (E9)) oder nur His-AtpC_{Eco} nach dem 2. Waschschrift (F, His-AtpC_{Eco} (9)).

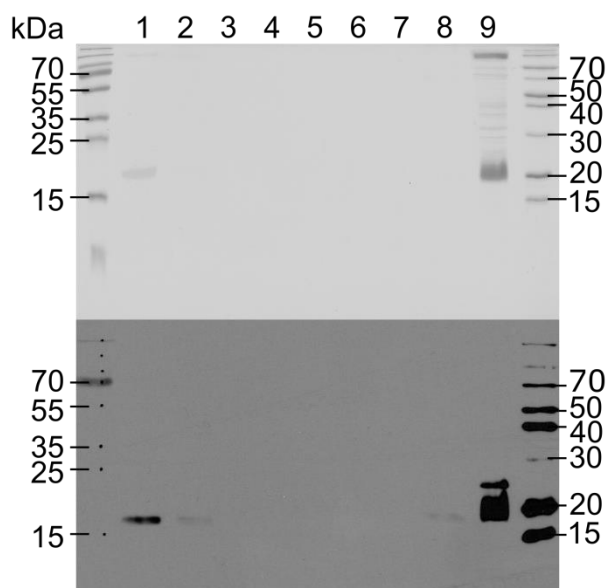


Abb. A 6: Bindung von Strep-AtpI_{Eco} an die Ni-NTA Matrix.

Nach der Inkubation (2 h bei 4 °C) von gereinigtem Strep-AtpI_{Eco} mit Ni-NTA Matrix wurde das Material gewaschen (1-7) und anschließend die verbliebenen Proteine mit Puffer A mit 500 mM Imidazol eluiert (8). Zur Orientierung wurde über die SDS-PAGE (oben) auch gereinigtes Strep-AtpI_{Eco} getrennt (9). Die Identifizierung von Strep-AtpI_{Eco} erfolgte auf einem Western Blot mit *Strep-Tactin*®-HRP Konjugat (unten). Als Proteinstandards dienen der *Page Ruler*TM *Plus Prestained Protein Ladder* (links) und der *PageRuler*TM *Unstained Broad Range Protein Ladder* (rechts).

Tab. A 1: Der Einfluss von pH-Stress auf die Verdopplungszeiten [h] während des exponentiellen Wachstums.

Stamm	TMM mit 50 mM Glukose			
	VK pH 6,0		VK pH 8,0	
	HK pH 6,0	HK pH 8,0	HK pH 8,0	HK pH 6,0
BW25113	1,20	0,79	0,84	1,22
ECB178	1,19	0,81	0,86	1,46
ECB179	1,13	0,83	0,87	1,50

Tab. A 2: Der Einfluss verschiedener Glukosekonzentrationen und pH-Stress auf die Verdopplungszeiten [h] während des exponentiellen Wachstums.

Stamm	TMM mit 25 mM Glukose		TMM mit 100 mM Glukose	
	VK pH 8,0		VK pH 8,0	
	HK pH 8,0	HK pH 6,0	HK pH 8,0	HK pH 6,0
BW25113	1,05	2,08	0,94	1,55
ECB178	1,06	2,00	0,97	1,74

Tab. A 3: Der Einfluss von DNP auf die Verdopplungszeiten [h] während des exponentiellen Wachstums.

TMM pH 7,0 mit 50 mM Glukose							
	-	Ethanol			DNP		
Stamm	-	0,7 %	1,75 %	2,625 %	0,2 mM	0,5 mM	0,75 mM
BW25113	0,92	0,89	1,01	1,10	1,02	1,16	1,56
ECB178	0,87	0,90	0,99	1,05	1,01	1,17	1,64

```

Pseudomonas -----MAAETASGYIQHHLQNLTFGRLPNGDWGFAHTAEQAKEMGFWAFHVDTLW
Shewanella -----MAAPGEALTPQGYIQHHLTNLHV-----GEGFWTWHIDSLFF
Klebsiella -----MTPQDYIGHHLNQLDLRFT---SL-VDPHNP-TATFWTLNIDSMFF
Enterobacter -----MASENMTQDYIGHHLTNLQMDLRTF---SL-VDPHNP-PATFWTLNIDSMFF
Salmonella -----MASENMTQDYIGHHLNQLDLRFT---SL-VDPQNP-PATFWTLNIDSMFF
Escherichia -----MASENMTQDYIGHHLNQLDLRFT---SL-VDPQNP-PATFWTLNIDSMFF
Citrobacter -----MASENMTQDYIGHHLNQLDLRFT---SL-VDPHNP-PATFWTLNIDSMFF
Proteus -----MSASGEALTTRDYIGGHLNQLDLRFT---EL-VNPHAENTPSFVWLNIDSLFF
Serratia -----MSASGENGTAKDYISHHLNQLDLRFT---QL-VEPHSG-TPTFWTLNIDSLFF
Yersinia -----MSASGEISTPRDYIGHHLNQLDLRFT---EL-VNPHSPGPATFWTLNIDSLFF
Cupriavidus MSAEATQGAEHVLTPSGYIAEHLQNFNSV-----GGKQHSVVDVSVLNIDYDVFVW
Bordetella -----MAAPSGASQSEYIQHHLVHLNNI-----GEKQSVIAQFNVINIDSLFW
Neisseria -----MAGETITAADYIKHHLQSLTSL-----DVTQGGQLKNIADFSFINLDAVFF
Diaphorobacter -----MAADAHAPTASEYIVHHLQHLQ-----NIKQKSIIDFSVVNLDVAV
Rhodoferox ---MAAEHAEVHAQTAGEYIQHHLHHLQKNF-----SF-ENVEQHSIVDFSVFNFDSLIY
** ** : * : **
    
```

```

Pseudomonas SVLLGVVFLFIFRLAALKKATSGQPGLQNFVEVMVEFVDTSVKDTFHGR--NPLIAPLAL
Shewanella SVGLGVLFLWIFRSVGGKATSGVPGKLCFIEIEMIVEFVDSVKESFHFGR--NALIAPLAL
Klebsiella SVVLGGLFLAMFRSVAKKATSGVPGKQFTFIEMIIGFVHGSVKDMYHGK--SKVIAPLAL
Enterobacter SVVLGGLFLAMFRSVAKKATSGVPGKQTAIELVIGFVHGSVKDMYHGK--SKLIAPLAL
Salmonella SVVLGGLFLVMFRSVAKKATSGVPGKQTAIELVIGFVHGSVKDMYHGK--SKLIAPLAL
Escherichia SVVLGGLFLVLFERSVAKKATSGVPGKQTAIELVIGFVNGSVKDMYHGK--SKLIAPLAL
Citrobacter SVVLGGLFLMLFRSVAKKATSGVPGKQTAIELVIGFVNGSVKDMYHGK--SKLIAPLAL
Proteus SVLMGGLFLWIFRKAARATSGVPGKQTAIELVIGFVDSVVRDMYHGK--SKLIAPLAL
Serratia SVVLGALFLFIFKKVANTATSGVPGKLTAVELIMGFVDSVVRDMYHGK--SKVIAPLAL
Yersinia SVVLGLAFLFVFRKVAAGATSGVPGKLTAVELIIGFVDSVVRDMYHGK--SKVIAPLAL
Cupriavidus SVLCGVIAILFLYMAARRVTAGVPRGFQAFVEMIVEMVDDQAKGIHGD--RSWIAPLAL
Bordetella SILMGLLVVFCWLWLAARATSGVPRGFQAFVEMIVEMVDDQAKSIVTNAKSRLFVAPLAL
Neisseria AVLLGVIGSFLLRGAKKATAGVPRGFQAAVEFLFEFVDDMCKSIHNEKSRKAVAPLGL
Diaphorobacter SVILGVLGLFVWMLAARTATSGVPRGFQAAVEMLVEMVDNQAKANIHNQSRKFIAPLAL
Rhodoferox SILLGAMACYFLWRAASKATSGVPRGFQAAVEILSEMVDNQAKGVIHNATSRKLVAPLAL
: : * : . : . : * * * : * : * : : * : : : : * : * : *
    
```

```

Pseudomonas TVFVWIFLNLIDLVPVDYLPMLAAKIT-----GDEHLFFRAVATTPDNATLGLSISVFA
Shewanella TIFMWFMMNFMMDMIPVDWLPWLAS-LA-----GIP--YLVVPTTDVNIITFSLAIGVFV
Klebsiella TVFVWVFLMNLMDLLPIDLLPYIGEHIF-----GLP--ALRVVPSADVNIITLSMALGVFI
Enterobacter TVFVWVFLMNLMDLLPIDLLPYIGEHVF-----GLP--ALRVVPSADVNIITLSMALGVFI
Salmonella TIFVWVFLMNLMDLLPIDLLPYIAEHWL-----GLP--ATRVPVPSADVNIITLSMALGVFI
Escherichia TIFVWVFLMNLMDLLPIDLLPYIAEHVL-----GLP--ALRVVPSADVNIITLSMALGVFI
Citrobacter TIFVWVFLMNLMDLLPIDLLPYIAEHWI-----GLP--ALRVVPSADVNIITLSMALGVFI
Proteus TVFVWVLLMNALDLLPIDFIPYIGEHIL-----GLP--ALRIVPTADVSITLSMAIGVFI
Serratia TVFVWVFLMNMMDLLPIDLLPFIGEHVF-----GLP--ALRVVPTADVSITLSMALGVFI
Yersinia TVFVWVLLMNMMDLLPIDLLPYIGEHVF-----GLP--ALRVVPTADVSITLSMALGVFI
Cupriavidus MVFCWITMNAIDLIPVDWVTGLNGLLGI---FHIHLPHHRAVATADLNGTLGMSCSVLV
Bordetella TVFLWIIILMNALDLLPVDLLPSIWRMTGLGAEGDPLYHRIILPTADLNVPMGMSLGVLL
Neisseria TLFVWVIFLMNAMDMPLPVDLLPMVWQGIT-----GNHHALRVVPTADLNTTLALAVGVLL
Diaphorobacter TVFVWVIFLMNAMDLLPVDLLPVLWQGAT-----GDSHAYLRVVPTADLSTTLGLSSAVLI
Rhodoferox TVFVWVIFLMNAMDMPLPVDAILPALWHTAGP---AMGYMNYMRVVPTADLSTTLGMSVSVLL
: * * : : * : * : * : * : : : : * : * : * : * : * : * : * : *
    
```

Die Abb. setzt sich auf der folgenden Seite fort.

7 Anhang

```

Pseudomonas      LIVFYSIKVKGIGGFLGELTLHPFSSKN-IVVQILLIPVNFLLEFVTLIAKPVSLALRRLF
Shewanella      LIIYYSIKVKGVSGFVKELTLQPFNHK-----AMIPVNLLLETVTTLIAKPISLALRRLF
Klebsiella      LIIFYYSIKMKGVGKELTMQPFNHW-----AFIPVNLILEGVSLLSKPVSLGLRRLF
Enterobacter    LILFYYSIKMKGVSFVKELTLQPFNHW-----AFIPVNLILEGVSLLSKPVSLGLRRLF
Salmonella      LILFYYSIKMKGIGGFAKELTLQPFNHW-----AFIPVNLILEGVSLLSKPVSLGLRRLF
Escherichia     LILFYYSIKMKGIGGFTKELTLQPFNHW-----AFIPVNLILEGVSLLSKPVSLGLRRLF
Citrobacter     LILFYYSIKMKGIGGFTKELTLQPFNHW-----AFIPVNLILEGVSLLSKPVSLGLRRLF
Proteus         LILFYYSIKMKGVGKFTKELTLQPFNHP-----VFIPINLILEGVSLLSKPVSLGLRRLF
Serratia       LILFYYSIKMKGVGKFTKELTMQPFNHP-----LFIPINLILEGVSLLSKPVSLGLRRLF
Yersinia       LILFYYSIKMKGVGKFTKELTMQPFNHP-----IFIPVNLILEGVSLLSKPVSLGLRRLF
Cupriavidus    LMIYYSFKIKGAGGFMHELFSAPFGAK-----WYLAPFNLVLNIEFLAKAVSLGMRLF
Bordetella     LMFYYGKIKHPGGFVKELTAPFHAHG--LASLVLAPFNLLNLIIEYAAKSVSLGMRLF
Neisseria      ICIYYNIKIKGLGGWFHELFSAPFGAKL-----APANFLLNLVEFLSKTVSHGMRLF
Diaphorobacter LCFVYSIKIKMGMGWAHELVTAPFGTSKNPVFALILGVVNLMLQIIEYVAKTVSHGMRLF
Rhodoferrax   VCLVYNVKIKGLGGWIHELLSAPFGDK-----FFLYPVNLLMQIIEFAAKTVSHGMRLF
: . *.:* * : ** ** * : : : : : * : * .:***

Pseudomonas      GNMAYAGELIFILIAVMFGSGMF-----LLSALGVALNWAWVFHILIIITLQAFIFM
Shewanella      GNLYAGELIFILIALMYGTNLL-----LSSLGVTLQLGWLIFHILVITLQAFIFM
Klebsiella      GNMAYAGELIFILIAAGLLP-----WWSQWVNLVNPWAI F H I L I I T L Q A F I F M
Enterobacter    GNMAYAGELIFILIAAGLLP-----WWSQWVNLVNPWAI F H I L I I T L Q A F I F M
Salmonella      GNMAYAGELIFILIAAGLLP-----WWSQWVNLVNPWAI F H I L I I T L Q A F I F M
Escherichia     GNMAYAGELIFILIAAGLLP-----WWSQWVNLVNPWAI F H I L I I T L Q A F I F M
Citrobacter     GNMAYAGELIFILIAAGLLP-----WWSQWVNLVNPWAI F H I L I I T L Q A F I F M
Proteus         GNMAYAGELIFILIAAGLLP-----WWSQWVNLVNPWAI F H I L I I T L Q A F I F M
Serratia       GNMAYAGELIFILIAAGLLP-----WWSQWVNLVNPWAI F H I L I I T L Q A F I F M
Yersinia       GNMAYAGELIFILIAAGLLP-----WWSQWVNLVNPWAI F H I L I I T L Q A F I F M
Cupriavidus    GNMAYAGELVFLLIALLGS IWTFSADLS---ALGFVGHV VAGTVWAI F H I L I V L L Q A F I F M
Bordetella     GNMAYAGELVFLLIALLGGAWTGFNGAS---IGLGIGHVLAGSVWAI F H I L I V L L Q A F I F M
Neisseria      GNMAYAGELVFLLIALLGGAWAASGSVEVMDPILFVFI IAGLAWAI F H I L V I T L Q A F I F M
Diaphorobacter GNMAYAGELVFLLIALLMGGAAAMSLSG---VLLPVGHI IAGSIWAI F H I L I I T L Q A F I F M
Rhodoferrax   GNMAYAGELVFLLIALLMGGTAWQFNPLSGWFWLGFVGHV IAGTAWSI F H I L V I T L Q A F I F M
**.:***:*.*** : * :****.: *****

Pseudomonas      MLTIVYLSMAHEDNH
Shewanella      MLTIVYLSMAHEDH-
Klebsiella      VLTIVYLSMASEEH-
Enterobacter    VLTIVYLSMASEEH-
Salmonella      VLTIVYLSMASEEH-
Escherichia     VLTIVYLSMASEEH-
Citrobacter     VLTIVYLSMASEEH-
Proteus         VLTIVYLSMASEEH-
Serratia       VLTIVYLSMASEEH-
Yersinia       VLTIVYLSMASEEH-
Cupriavidus    MLTLVYIGQAHDHH-
Bordetella     MLTLVYIGQAHEGH-
Neisseria      ALAFVYIGQAHAH-
Diaphorobacter MLTLIYLGQAHEAH-
Rhodoferrax   MLTLIYVGAHSSH-
*.:*:.. * . :

```

Abb. A 7: Multiple sequence alignment von AtpB verschiedener Organismen.

Das Alignment wurde mit CLUSTAL O 1.2.1 erstellt. Die Symbole unter den Sequenzen geben Positionen mit vollständig konservierten (*), sowie sehr (:) oder schwach (.) ähnlichen AS an. Die Sequenzen stammten von *E. coli* K12 MG1655 (VIMSS17798), *C. metallidurans* CH34 (VIMSS1775890), *Neisseria meningitidis* 053442 (VIMSS3543549), *Bordetella pertussis* Tohama I (VIMSS514564), *Diaphorobacter sp.* TPSY (VIMSS5786153), *Rhodoferrax ferrireducens* DSM 15236 (VIMSS1270442), *Citrobacter rodentium* ICC168 (VIMSS10401148), *Salmonella typhimurium* LT2 (VIMSS151151), *Enterobacter sp.* 638 (VIMSS3627314), *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* MGH 78578 (VIMSS3384620), *Proteus mirabilis* HI4320 (VIMSS5785168), *Serratia proteamaculans* 568 (VIMSS3617943), *Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica* 8081 (VIMSS2079578), *Pseudomonas aeruginosa* PA7 (VIMSS7069243) und *Shewanella oneidensis* MR-1 (VIMSS203822).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. D. H. Nies für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und vor allem für die hilfreichen Diskussionen, die das Vorankommen meiner Arbeit gesichert haben.

Dr. Falk Kalamorz danke ich für die Überlassung des Themas, die zahlreichen Diskussionen auch über große Distanz und das gute Arbeitsklima, das mich immer wieder aufs Neue motiviert hat mit meiner Arbeit fortzusetzen und neuen Ideen zu folgen.

Ich danke allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Nies (wie z. B. Andreas, Nicole, Martin, Lucy, Grit, Fr. Otto) für das angenehme Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und Diskussionen. Besonderer Dank geht an Diana, die mir im Labor eine sehr große Hilfe war und mit deren Unterstützung der praktische Teil meiner Arbeit viel schneller voranging. Christopher danke ich für kameradschaftliche Atmosphäre, die Tipps und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Du warst für mich immer ein Ruhepol im hektischen Laboralltag.

Ich danke auch unseren Studenten Sara, Basti, Juliane, Nicole, Toby, Sandy, Romy und mehr, die viel Leben ins Labor gebracht haben und mit denen die Zusammenarbeit immer Spaß gemacht hat!

Ich danke auch Herrn Prof. G. R. Sawers und seiner Arbeitsgruppe (wie z. B. Marco, Dörte, Doreen, Kinga, Lydia, Lydia und mehr) für die hilfreichen Diskussionen, die Unterstützung im Laboralltag und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Ich danke auch meiner Familie und Freunden für die Unterstützung und Motivation in allen Lebenslagen. Ihr gebt mir die Kraft alles zu erreichen was ich mir vorgenommen habe und noch vornehmen werde.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anja Heinz
Geburtsdatum: 18.04.1986
Geburtsort: Berlin

Beruflicher Werdegang

01.2012 – 12.2015 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I, in der Abteilung Molekulare Mikrobiologie von Prof. Dr. D. H. Nies des Instituts für Biologie

Ausbildung

10.2008 – 05.2011 Masterstudium der Molekular- und Zellbiologie an der Freien Universität Berlin

Schwerpunkten in molekulare Mikrobiologie, bakterielle Zellbiologie, mikrobielle Biotechnologie, Pflanzenmolekularbiologie

Masterarbeit mit dem Thema Die molekulare Charakterisierung der Thermotoleranz in *Bacillus subtilis* in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Turgay

10.2005 – 09.2008 Bachelorstudium der Biologie an der Freien Universität Berlin

Schwerpunkte in Mikrobiologie, Tier- und Pflanzengenetik

Bachelorarbeit in der Mikrobiologie mit dem Thema Interaktionen zwischen Chaperon- und Proteolysesystemen in *Bacillus subtilis* in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Turgay

09.1998 – 06.2005 Abitur am Gymnasium Oberschule am Elsengrund, Berlin

09.1992 – 06.1998 Brodowiner Grundschule, Berlin

Halle (Saale), März 2017

.....

Anja Heinz

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die eingereichte Doktorarbeit mit dem Titel „Die Bedeutung von AtpI für die F_1F_0 -ATPase in *Escherichia coli* und *Cupriavidus metallidurans*“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), März 2017

.....

Anja Heinz