

**Regulation der Synthese der  
Glukosamin-6-Phosphat Synthase GlnS  
in *Escherichia coli* durch das neuartige  
Protein YhbJ**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Falk Kalamorz**

aus

Bad Lauterberg

**Göttingen 2008**

D7

Referent: Prof. Dr. Jörg Stülke

Korreferent: Dr. Michael Hoppert

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2009

*Goodbye, old friend, goodbye.*

*Good night.*

*I'll move on,*

*you'll call it fate,*

*I'll call it karma.*

*We had our time,*

*it was fun while it lasted.*

*I'll look back,*

*with honour and no regrets.*

*I won't be mad,*

*won't feel bad,*

*these memories will never leave me.*

*Don't be sad,*

*because life goes on,*

*life goes on.*

*It's getting too late,*

*tomorrow is here.*

Silverstein - *Call it karma*

## Danksagung

Bevor ich hier in die Details gehe möchte ich erstmal allen danken.

Jedem Einzelnen, der mich in den letzten Jahren (oder überhaupt einmal) in dem unterstützt hat, was ich gemacht habe.

Nicht nur im Labor, sondern insgesamt.

Es gibt so viele Leute, die hier nicht persönlich erwähnt werden, die aber trotzdem auf die eine oder andere Art dazu beigetragen haben, dass ich heute an diesem Punkt angelangt bin.

Das hier geht an alle, die an mich geglaubt haben.

An alle, die mir offen begegnet sind.

An alle, die mir gesagt haben, das sie gut finden, was ich mache.

Euch allen sei hiermit gesagt:

Danke für alles!

So, nach dieser allgemeinen Ansage nun zu den Einzelheiten:

An erster Stelle danke ich natürlich Professor Jörg Stülke, in dessen Abteilung ich meine Doktorarbeit anfertigen durfte und Dr. Boris Görke für das interessante Projekt und die Unterstützung meiner Arbeiten.

Dr. Michael Hoppert gebührt mein herzlicher Dank für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Slawomir Milewski hat uns glücklicherweise FMDP überlassen, und von Bernard Badet erhielten wir die Antikörper gegen GlmS. Karin Schnetz danke ich nicht nur für die wiederholte Versorgung mit Stämmen und Plasmiden, sondern auch für die freundliche Betreuung während meines Aufenthalts in Köln. Jörg Vogel möchte ich für die Möglichkeit danken, dass ich mehrere Wochen in Berlin arbeiten durfte, in denen ich sehr viel gelernt und Neues kennengelernt habe. Kai Papenfort hat mich in dieser Zeit sehr gut in meiner Arbeit unterstützt und war immer da, wenn es mal brannte.

Natürlich bedanke ich mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Görke für die Zusammenarbeit. Ganz besonders erwähnen möchte ich hier Ricarda, Antje und Sabine, und es hat viel Spaß gemacht, mit euch zu arbeiten. Und natürlich Maria, die sich immer bemüht hat, eine angenehme Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

## Danksagung

---

Sabine Lentes hat mich nicht nur äußerst kompetent in meiner Arbeit unterstützt, sondern auch immer Rücksicht genommen, wenn ich mal einen *sehr* schlechten Tag hatte. Danke, dass du dir diese Mühe gemacht hast. Du hast mir sehr geholfen.

So, jetzt bin ich schon beim Rest der Abteilung. Christina Herzberg und Julia Busse halfen mir immer mit Rat und Tat, wenn es nötig war. Ebenso waren alle Kollegen immer eine große Hilfe (nicht nur im Labor) und es war toll, in diesem Umfeld zu arbeiten. Und natürlich ein herzliches Dankeschön an all die guten Geister des Instituts, die immer alles am Laufen halten: Bärbel, Nicole, Olaf, Patrick und Gerd.

Ein kurzes Gedenken an die, die von uns gegangen sind...

Die AG Mascher hat mir verdammt gefehlt in der letzten Zeit, und damit meine ich nicht nur die Kaffeemaschine!

Thorsten, nochmals: Danke für alles.

Sina, du warst immer für mich da, und hast auch mein ständiges Jammern auf hohem Niveau ertragen. Ich wünsch dir alles Gute für deine Zukunft (ohne Labor?!?).

Jessi, was hätte ich ohne dich nicht alles verpasst ☺. Danke, dass du mich immer mal wieder für ein paar Stunden aus meiner kleinen (Labor-) Welt geholt hast, und für ein paar ziemlich coole Aktionen.

Sebastian, wenn es nicht das Schicksal war, das uns beide zusammengeführt hat, muss es der Teufel gewesen sein ☺. Wird schwer nach so langer Zeit ohne dich klar kommen zu müssen.

Meiner Familie kann ich nur dasselbe sagen wie immer: Danke für alles, was ihr je für mich getan habt. Ich weiß, dass ihr immer an mich geglaubt habt, und jetzt bin ich da, wo ich sein wollte. Ihr habt mich immer unterstützt und all meine Spinnereien ertragen. Ich liebe euch!

Gudrun, ich liebe dich! Du bist mein Antrieb, mein Halt und mein Schutz.

Du bist das Einzige auf dieser Welt, das ich nie mehr missen möchte.

*Sometimes I feel like I'm still dreaming...*

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1. <i>E. coli</i> als Modellorganismus	2
2.2. Regulation der Genexpression	2
2.3. Das <i>rpoN</i> -Operon	3
2.3.1. <i>rpoN</i>	4
2.3.2. <i>hpf</i>	6
2.3.3. <i>ptsN</i> und <i>npr</i>	6
2.3.4. <i>yhbJ</i>	9
2.3.5. Die Deletion von <i>yhbJ</i> führt zu einer Akkumulation von GlmS	9
2.4. Aminosucker-Metabolismus	11
2.4.1 Die Glukosamin-6-Phosphat Synthase GlmS	11
2.4.2. Kataboler Abbau von Glukosamin-6-P	13
2.4.3. Regulation des <i>glmUS</i> -Operons durch NagC	14
2.4.4. Regulation von GlmS in <i>B. subtilis</i> und in Eukaryoten	15
2.4.5. YhbJ-abhängige Regulation der <i>glmS</i> -Expression durch Stabilisierung einer <i>glmS</i> -spezifischen mRNA	17
2.5. Fragestellung der Arbeit	20
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1. Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	21
3.2. Medien und Antibiotika	21
3.2.1. Luria Bertani (LB) –Medium	21
3.2.2. M9-Minimalmedium	21
3.2.3. SOB/SOC-Medium	22
3.2.4. McConkey/Lac-Plattenmedium	23
3.2.5. Antibiotika	23
3.2.6. Weitere Medienzusätze	23

3.3. Mikrobiologische Methoden	24
3.3.1. Anzucht und Konservierung von Bakterien	24
3.3.2. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	24
3.3.3. Transformation von <i>E. coli</i>	25
3.3.4. $\beta$ -Galaktosidase-Assay	25
3.3.5. Transposonmutagenese	27
3.4. Präparation und Nachweis von DNA	28
3.4.1. Präparation chromosomaler DNA	28
3.4.2. Fällung von DNA	28
3.4.3. Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA	29
3.4.4. Reinigung von DNA und Gelelektion	29
3.4.5. Agarose-Gelelektrophorese von DNA	30
3.5. Allgemeine Klonierungstechniken und Enzymreaktionen mit DNA	31
3.5.1. Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)	31
3.5.2. Semi-random two-step PCR (ST-PCR)	31
3.5.3. Generierung von Gen-Deletionen	33
3.5.3.1 Vorbereitung der Stämme	34
3.5.3.2. Amplifikation der Resistenzkassette mit homologen Bereichen zu den flankierenden Sequenzen des Zielgens	34
3.5.3.3. Herstellung elektrokompeter Zellen	35
3.5.3.4. Elektroporation	35
3.5.3.5. Entfernen der Kassette	36
3.5.4. Restriktion von DNA	36
3.5.5. Dephosphorylierung	37
3.5.6. Ligation	37
3.5.7. Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	38
3.6. Präparation, Synthese und Nachweis von RNA	38
3.6.1. Präparation von Gesamt-RNA	38
3.6.2. Fällung von RNA	39
3.6.3. <i>In vitro</i> Transkription T7	39
3.6.4. Nachweis von RNA	40
3.6.5. Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden für Northern Blot Analysen	41
3.6.6. Herstellung $^{32}\text{P}$ -markierter Sonden für Northern Blot Analysen	42
3.6.7. Northern Blot Analyse (für Detektion mit DIG-markierten Sonden)	43
3.6.8. Slot Blot Analyse (für Detektion mit DIG-markierten Sonden)	44

3.6.9. Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden und Detektion	46
3.6.10. Northern Blot Analyse (für Detektion mit $^{32}\text{P}$ -markierten Sonden)	47
3.6.11. Hybridisierung mit $^{32}\text{P}$ -markierten Sonden und Detektion	48
3.6.12. Präparation und Markierung von RNA für MicroArray-Analysen	48
3.6.13. MicroArray-Analysen	50
3.6.14. Markierung von RNA mittels $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP für EMSA	50
3.7. Präparation und Nachweis von Proteinen	52
3.7.1. Präparation cytoplasmatischer Proteine aus <i>E. coli</i>	52
3.7.2. Optimierung der Expression heterologer Proteine in <i>E. coli</i>	54
3.7.3. Aufreinigung von His-Tag-tragenden Proteinen mittels $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säulen	55
3.7.4. Dialyse von Proteinen	55
3.7.5. Proteinmengenbestimmung	56
3.7.6. Denaturierende Proteingelelektrophorese	57
3.7.6.1. Vorbereitung der Proben	57
3.7.6.2. Herstellung denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gele	58
3.7.6.3. Gelelektrophorese	59
3.7.6.4. Färbung mittels Coomassie Brilliant Blue R	59
3.7.7 Western Blot Analyse	60
3.7.7.1. Herstellung polyklonaler Antikörper	60
3.7.7.2. Aufreinigung des Antikörpers	60
3.7.7.3. Transfer und Detektion	61
3.8. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	63
3.8.1. EMSA mit nicht-markierter RNA	63
3.8.1.1. Native Polyacrylamid-Gele	63
3.8.1.2. Vorbereitung der Proben	63
3.8.1.3. Gelelektrophorese	64
3.8.2. EMSA mit $^{32}\text{P}$ -markierter RNA	65
3.8.2.1. Native Polyacrylamid-Gele für EMSA mit $^{32}\text{P}$ -markierter RNA	65
3.8.2.2. Vorbereitung der Proben	65
3.8.2.3. Gelelektrophorese	66
3.9. Computergestützte Datenanalyse von DNA- und Proteinsequenzen und Literaturrecherche	66



<b>4. Ergebnisse</b>	<b>68</b>
4.1. Die Regulation der <i>glmS</i> -Expression in <i>Escherichia coli</i>	68
4.1.1. Transposonmutagenese und Charakterisierung der Mutanten	68
4.1.2. Untersuchung der Rolle von GlmZ	72
4.1.3. Die Expression von <i>glmZ</i> ist nicht durch YhbJ beeinflusst oder autoreguliert	76
4.1.4 Die Rolle von Hfq in der Regulation der <i>glmS</i> -Expression <sup>77</sup>	
4.1.5. Die Rolle von RNase E in der Regulation der <i>glmS</i> -Expression	78
4.2. Identifikation des Signals	80
4.2.1. Die Inaktivierung von GlmS führt zu einer verstärkten Aktivität der <i>glmS-lacZ</i> -Reporterfusion	80
4.2.2. Identifikation des Signal-Metabolits	84
4.2.3. Die Rolle von GlmZ in der metabolitengesteuerten Regulation der <i>glmS</i> -Expression	93
4.3. Charakterisierung von YhbJ	95
4.3.1. Analyse mittels ClustalW und MEME	95
4.3.2. Phylogenetische Analyse	97
4.3.3. Identifikation einer potenziellen RNA-Bindedomäne	99
4.3.4. Mutationsanalyse konservierter Reste und Motive in YhbJ100	
4.4. Untersuchungen zur Interaktion von YhbJ mit GlmY/GlmZ	104
4.4.1. Überexpression His(10)-YhbJ	104
4.4.2. <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	106
4.5. Expression des <i>rpoN</i> -Operons	110
4.5.1. Untersuchung zur Expression des <i>rpoN</i> -Operons mittels <i>lacZ</i> -Reporterfusionen	111
4.5.2. Einfluss des Aminozucker-Metabolismus auf die Expression des <i>rpoN</i> -Operons	113
4.5.3. Einfluss von GlmY und GlmZ auf die Expression des <i>rpoN</i> -Operons	118
4.6. Untersuchung der Auswirkungen einer <i>yhbJ</i> -Deletion mittels MicroArray Analysen	119
<b>5. Diskussion</b>	<b>125</b>
5.1. Feedback-Kontrolle der <i>glmS</i> -Expression	125

5.2. Die Funktion von YhbJ	132
5.3. MicroArray Analysen eines $\Delta yhbJ$ -Stammes im Vergleich zum Wildtyp	133
5.3.1. Chaperone und Proteasen der Stressantwort	134
5.3.2. Enzyme der Pyrimidinsynthese	137
5.3.3. Komponenten von Transportkomplexen	139
5.3.4. Gene regulatorischer Proteine mit erhöhter Expression im $\Delta yhbJ$ -Hintergrund	141
5.3.5. Das Kälteschockprotein CspA	143
5.3.6. Gene der Lipopolysaccharid-Kernsynthese	143
5.3.7. Gene regulatorischer Proteine mit erniedrigter Expression im $\Delta yhbJ$ -Hintergrund	145
5.4. Vergleich der Auswirkungen einer <i>yhbJ</i> -Deletion mit der Überexpression von GlmY und GlmZ in MicroArray Analysen	146
5.5. Expression des <i>rpoN</i> -Operons	148
5.6. Ausblick	149
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>152</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>174</b>
7.1. Stämme	174
7.2. Plasmide	176
7.3. Oligonukleotide	179
7.4. Zusätzlich verwendete Materialien	184
7.4.1. Chemikalien	184
7.4.2. Antikörper, Enzyme und Oligonukleotide	185
7.4.3. Hilfsmittel	185
7.4.4. Geräte	186
7.4.5. Computerprogramme	187
7.5. Rohdaten der $\beta$ -Galaktosidase-Messungen	187
7.6. Rohdaten zur Charakterisierung von YhbJ	193
7.6.1. Verwendete Proteinsequenzen	193
7.6.2. Clustal W-Analyse	200
7.6.3. RNABindR-Vorhersagen	208
7.7. Rohdaten der MicroArray Analyse	212

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> , ATP-bindende Kassette
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B.	Bacillus
bidest.	deionisiert
CTP	Cytosintriphosphat
dest.	destilliert
DIG	Dioxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.	<i>Escherichia</i>
EI	Enzym I des PTS
EII	Enzym II des PTS
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FMDP	N3-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanol-Säure
fwd	Vorwärtsprimer
GlcN	Glukosamin
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Aminosäure Histidin
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
IPITG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani (Medium)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MOPS	3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure
MW	<i>Molecular weight</i> , Molekulargewicht
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl-β-Galactopyranosid
P	Promotor
-P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP I	Poly(a)-Polymerase I
P:C:I	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PTS	Phosphoenolpyruvat:Zucker-Phosphotransferasesystem
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rev	reverser Primer
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sRNA	kleine, nicht-kodierende RNA
ST-PCR	<i>Semi-random two-step PCR</i> , halb-gerichtete, zweistufige PCR
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	transfer-RNA, Transfer-Ribonukleinsäure
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UV	Ultraviolett
ZAP	Zellaufschlußpuffer

## 1. Zusammenfassung

Aminozucker sind essentielle Bausteine des Lebens, die in Bakterien vor allem als Vorläufer der Zellwandbiosynthese dienen. Ihre *de novo*-Synthese beginnt mit der Umsetzung von Fruktose-6-Phosphat und Glutamin zu Glukosamin-6-Phosphat und Glutamin. Diese Reaktion wird durch die Glukosamin-6-Phosphat Synthase GlmS katalysiert. *Escherichia coli* ist in der Lage, externe Aminozuckerquellen zu verwerten, und unter diesen Bedingungen ist die Aktivität von GlmS nicht essentiell.

Für eukaryotische Organismen und Gram-positive Bakterien sind Mechanismen beschrieben, die die Expression oder Enzymaktivität von GlmS an die Verfügbarkeit des eigenen Produktes oder von Metaboliten stromabwärts davon in der Zellwandbiosynthese koppeln. In *E. coli* war eine derartige Regulation bislang unbekannt.

Die Beobachtung, dass Stämme mit einer Deletion des Gens *yhbJ* eine starke Erhöhung der intrazellulären GlmS-Menge aufweisen, gab einen ersten Ansatzpunkt für die Suche nach einer Kontrolle der Aktivität dieses Enzyms in *E. coli*.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die spezifische Expression von *glmS* einer posttranskriptionellen Kontrolle unterliegt. Mittels Transposonmutagenese konnte die kleine, nicht-kodierende RNA GlmZ als notwendiger Faktor für diese Regulation identifiziert und ein Einfluß von Rnase E und Hfq beschrieben werden. Diese Regulation stellt einen der ersten beschriebenen Fälle dar, in denen eine kleine RNA die Transkription eines Gens innerhalb eines Operons positiv beeinflusst.

Des Weiteren konnte die intrazelluläre Verfügbarkeit von Glukosamin-6-Phosphat als Signal für diese Regulation identifiziert werden. Somit erfolgt die Kontrolle der *glmS*-spezifischen Expression durch einen negativen *Feedback*-Mechanismus.

Zudem wurde das Protein YhbJ analysiert und mehrere konservierte Motive in der Aminosäuresequenz identifiziert. Anschließend wurde der Einfluß von Mutationen dieser Reste untersucht. Es wurde gezeigt, dass YhbJ *in vitro* an RNA binden kann. Ausserdem wurde die globale Auswirkung einer *yhbJ*-Deletion auf die Transkription mittels MicroArray Analysen untersucht.

## **2. Einleitung**

### **2.1. *E. coli* als Modellorganismus**

Prokaryoten stellen, neben Archaea und Eukaryoten, eine der drei Domänen des Lebens dar und umfassen alle Organismen, deren DNA nicht durch eine Kompartimentierung vom Cytoplasma der Zelle getrennt ist und deren Ribosomen aus einer 50S und einer 30S-Untereinheit aufgebaut sind. Erstmals beobachtet wurden Prokaryoten im Jahr 1676 durch Antoni van Leeuwenhoek, und in den nachfolgenden 300 Jahren wurden über 5000 Arten beschrieben (Madigan *et al.* 2003).

*Escherichia coli* (*E. coli*) ist ein stäbchenförmiges, Gram-negatives Bakterium. Systematisch gehört es zur Klasse der Gamma-*Proteobacteria* und zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Sein natürliches Habitat ist der Intestinaltrakt von Menschen und Tieren. 1885 wurde es durch Theodor Escherich erstmals beschrieben (Madigan *et al.* 2003).

In den über 100 Jahren seit seiner Entdeckung hat sich *E. coli* zu einem der am besten untersuchten Organismen der Welt entwickelt, und stellt ein wichtiges Modell für die zelluläre Grundlagenforschung dar. Zudem wurde das Genom von *E. coli*, welches etwa 4400 Gene in  $4,64 \times 10^6$  Basenpaaren umfasst, als eines der ersten vollständig sequenziert (Blattner *et al.* 1997; Serres *et al.* 2001). *E. coli* ist genetisch leicht zugänglich und kann sowohl über Transformation, Konjugation als auch Transduktion manipuliert werden (Madigan *et al.* 2003).

Auch in der Industrie ist *E. coli* ein wichtiger Organismus, beispielsweise für die Produktion von Insulin (Goeddel *et al.* 1979) und Vitamin K (Bentley und Meganathan 1982).

### **2.2. Regulation der Genexpression**

Um auf äußere Reize und Veränderungen ihrer Umgebung reagieren zu können, besitzen bakterielle Zellen Rezeptoren, die essentielle Parameter wahrnehmen (Seshasayee *et al.* 2006). Ein Beispiel für ein derartiges Sensorsystem sind Zweikomponentensysteme. Diese bestehen aus einer meist membranständigen Sensor-Kinase und einem cytoplasmatischen *Response Regulator*. Wenn ein Reiz detektiert wird, kommt es zunächst zur Autophosphorylierung der Sensor-Kinase unter ATP-

Verbrauch und nachfolgend zur Übertragung der Phosphatgruppe auf den zugehörigen *Response Regulator*. Dieser wird dadurch aktiviert und ist nun in der Lage, an regulatorische Elemente in der DNA zu binden und die Transkription von Zielgenen zu beeinflussen (Parkinson 1993). Eine weitere Möglichkeit, auf veränderte Umwelteinflüsse zu reagieren, ist die Verwendung alternativer  $\sigma$ -Faktoren. Diese sind in der Lage, eine Promotorspezifität des RNA-Polymerase-Holoenzym zu vermitteln, so dass je nach assoziierten  $\sigma$ -Faktor ein spezielles Set an Genen aktiviert wird (Helmann 2002; Raivio 2005).

Diese beiden Systeme wirken auf der Ebene der Transkription. Neben dieser kann eine Antwort auf veränderte Lebensbedingung auch durch Veränderung der Translation oder Regulation der enzymatischen Aktivität von Enzymen vermittelt werden.

Die Translation kann durch Stabilisierung beziehungsweise Destabilisierung der entsprechenden mRNA beeinflusst werden (Condon 2003). Hierzu gibt es eine Vielzahl verschiedener Mechanismen: Schutz vor Abbau der mRNA durch verstärkte Translation (Deana und Belasco 2005), Modifikation des 5'-terminalen Phosphorylierungsstatus (Celesnik *et al.* 2007), 3'-Polyadenylierung (Joanny *et al.* 2007), Ausbildung von Sekundärstrukturen (Kozak 2005) oder Interaktion mit Proteinfaktoren und ribosomale Initiationskomplexen (Sharp und Bechhofer 2003). Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Beeinflussung der mRNA-Stabilität sind die in *trans* wirkenden kleinen, nicht-kodierenden RNAs (Gottesman *et al.* 2006).

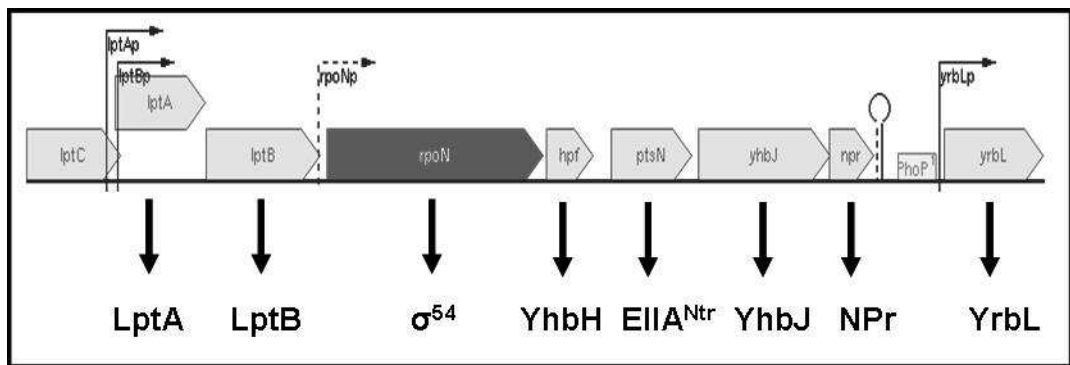
Die enzymatische Aktivität von Proteinen kann beispielsweise durch *Feedback*-Hemmung durch das Produkt einer Synthesereaktion beeinflusst werden (Madigan *et al.* 2003) oder durch die Verfügbarkeit eines Ko-Faktors (Holliday *et al.* 2007).

### 2.3. Das *rpoN*-Operon

Das *rpoN*-Operon besteht aus den 5 Genen *rpoN*, *hpf* (vormals *yhbH*), *ptsN*, *yhbJ* und *npr* (vormals *ptsO*) ((GOA *et al.* 2001), siehe Abbildung 1.1.). Es umfasst etwa 5300 Basenpaare und wird von einem  $\sigma^{70}$ -abhängigen Promotor vor *rpoN* aus exprimiert. Die Termination erfolgt Rho-abhängig stromabwärts von *npr* (Jones *et al.* 1994). Die Expression von diesem Promotor aus ist konstitutiv (Castano und Bastarrachea 1984) und die Anzahl an  $\sigma^{54}$ -Molekülen in der Zelle unterliegt nur vernachlässigbaren Schwankungen (Jishage *et al.* 1996).

Angrenzend befinden sich stromaufwärts das *lptAB*-Operon, welches unter Kontrolle eines  $\sigma^E$ -abhängigen Promotors steht und für Proteine kodiert, die am Export von

Bestandteilen der Lipopolysaccharide der äußeren Membran beteiligt sind (Sperandeo *et al.* 2006; Sperandeo *et al.* 2007). Stromabwärts befindet sich das monocistronische *yrbL*-Operon. Die Funktion des korrespondierenden Genproduktes ist nicht näher charakterisiert, jedoch steht das Operon unter der Magnesium-abhängigen Kontrolle des PhoPQ-Systems (Minagawa *et al.* 2003) und des EvgAS-Systems (Eguchi *et al.* 2004). Neben einem Transkript, welches das gesamte Operon umfasst, wurde auch ein Transkript nachgewiesen, das auf einem Durchlesen ausgehend vom *lptB*-Promotor beruht und somit zusätzlich zum *rpoN*-Operon auch *lptB* und Bereiche stromaufwärts von dessen Startpunkt umfasst (Rhodius *et al.* 2006).



**Abb. 2.1.:** Das *rpoN*-Operon in *E. coli*

Schematische Darstellung des *rpoN*-Operons sowie der flankierenden genetischen Elemente. Promotoren sind durch rechtwinklige Pfeile dargestellt, Terminatoren durch Haarnadeln. Das *rpoN*-Operon besteht aus den fünf Genen *rpoN*, *hpf*, *ptsN*, *yhbJ* und *npr*. Die Expression erfolgt von einem  $\sigma^{70}$ -abhängigen Promotor stromaufwärts von *rpoN* aus und endet an einem Rho-abhängigen Terminator hinter dem Gen *npr*. Stromaufwärts befindet sich das *lptAB*-Operon, dessen Genprodukte in den Transport von Lipopolysacchariden involviert sind, stromabwärts das monocistronische *yrbL*, ein Gen unbekannter Funktion. Unter der Darstellung der Gene sind die Bezeichnungen der entsprechenden Genprodukte angegeben. Abbildung modifiziert nach EcoCyc (siehe 2.9.)

### 2.3.1. *rpoN*

Das erste Gen im Operon, *rpoN*, codiert für den alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^{54}$ . Sigma-Faktoren sind Teil des RNA-Polymerase-Holoenzym und beeinflussen das Muster der Genexpression, indem sie die RNA-Polymerase zu spezifischen Promotoren rekrutieren (Helmann und Chamberlin 1988; Wosten 1998). Die Anzahl an  $\sigma$ -Faktoren in einem bakteriellen Genom reicht von 1 in *Mycoplasma genitalium* bis zu 63 in *Streptomyces coelicolor* (Gruber und Gross 2003). Neben der Vermittlung von Promotorspezifität haben  $\sigma$ -Faktoren weitere wichtige Aufgaben: Sie dienen als Interaktionspartner für Transkriptionsregulatoren, erleichtern das Aufschmelzen der DNA-Helix und beeinflussen die frühe Phase der Elongation sowie das Pausieren der Transkription hinter dem Promotor (Gruber und Gross 2003).

In *E. coli* wurden bislang sieben unterschiedliche Sigma-Faktoren identifiziert, darunter der allgemeine oder primäre Sigma-Faktor  $\sigma^{70}$  sowie zum Beispiel Sigma-Faktoren, die die Antwort auf Stress durch Hitzeschock oder fehlgefaltete periplasmatische Proteine vermitteln (Madigan *et al.* 2003).  $\sigma^{54}$  ist der einzige Sigma-Faktor in *E. coli*, der nicht homolog zu  $\sigma^{70}$  ist und deshalb einige einzigartige Eigenschaften besitzt (Merrick 1993). Seine Aktivität ist strikt von einem zusätzlichen Aktivatorprotein abhängig, welches ATP hydrolysiert und so die Energie für den Übergang des RNA-Polymerase-Holoenzym von der geschlossenen zur offenen Konformation liefert. Dadurch kann  $\sigma^{54}$ -abhängige Genexpression vollständig abgeschaltet werden. Zudem unterliegen die Position und Orientierung der Aktivatorbindestelle an der DNA keinen bekannten Regeln, jedoch befindet sich keine der bislang identifizierten Bindestellen innerhalb eines Gens (Buck *et al.* 2000; Reitzer und Schneider 2001). Sie kann jedoch bis zu 3000 Basenpaare vom Transkriptionsstartpunkt entfernt liegen (Reitzer und Magasanik 1986), und in *B. subtilis* liegt die Aktivatorbindestelle in mindestens einem Fall stromabwärts des durch sie kontrollierten Gens (Belitsky und Sonenshein 1999).

Häufig wird  $\sigma^{54}$  ausschließlich als Sigma-Faktor zur Expression der Gene des Stickstoff-Stoffwechsels der Zelle angesehen, jedoch ist etwa die Hälfte der bekannten oder vermuteten Zielgene von  $\sigma^{54}$  nicht mit der Assimilation von Stickstoff assoziiert (Studholme und Buck 2000) und vermittelt unter anderem die Antwort auf Phagenschock und alkalische pH-Werte oder kodieren für Proteine des Fettsäurestoffwechsels (Reitzer 2003). Die zugehörigen von  $\sigma^{54}$  kontrollierten Promotoren werden jedoch allgemein als Stickstoff-Promotoren bezeichnet und zeichnen sich in *E. coli* durch folgende Konsensus-Sequenz aus: aa-N<sub>3</sub>-TGGCAc-N<sub>6</sub>-TGCNNt. Große Buchstaben bedeuten keine Abweichung in den 17 bekannten  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotoren, kleine Buchstaben 2-5 Abweichungen (Reitzer und Schneider 2001). In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von lytischen und strukturellen Genen einiger Bakteriophagen von  $\sigma^{54}$  abhängig ist (Ceyssens *et al.* 2008). Untersuchungen der Struktur von  $\sigma^{54}$  mittels *scanning force microscopy* (Rippe *et al.* 1997) und Röntgen-Streuungsmikroskopie (Svergun *et al.* 2000) zeigten trotz des Mangels an Sequenz-Homologie eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Strukturen von  $\sigma^{54}$  und dem allgemeinen Sigma-Faktor  $\sigma^{70}$ . Beide interagieren auf dieselbe Art mit der RNA-Polymerase (Wigneshweraraj *et al.* 2008), nämlich über eine Region aus sich wiederholenden sauren, hydrophoben Aminosäuren. Die Bindung von  $\sigma^{54}$  an die Promotor-DNA erfolgt über ein „*Helix-turn-helix*“-Motiv am Carboxy-



terminalen Ende (Sasse-Dwight und Gralla 1990; Wong *et al.* 1994) und führt zu starken Konformationsänderungen im Protein (Ray *et al.* 2005).

Im Gegensatz zur  $\sigma^{70}$ -abhängigen Genexpression erfolgt in RNA-Polymerase-Holoenzymen mit  $\sigma^{54}$ -Untereinheit kein spontaner Übergang in die für die Transkription notwendige offene Konformation. Die Initiation der Transkription  $\sigma^{54}$ -abhängiger Promotoren ist strikt von AAA<sup>+</sup>-Aktivatoren (*ATPases associated with various cellular activities* / ATPasen verbunden mit unterschiedlichen zellulären Aktivitäten) abhängig (Buck *et al.* 2000). Diese Proteine bilden polymere Ringe, in denen Teile zweier nebeneinander liegender Protomere gemeinsam ein aktives Zentrum der ATPase-Aktivität bilden (Schumacher und Brennan 2002; Zhang *et al.* 2002). Als Reaktion auf sensorische Reize werden sie aktiviert und binden *Enhancer*-Sequenzen auf der DNA nahe des Promotors. Die durch die ATP-Hydrolyse gewonnene Energie wird in mechanische Kraft umgesetzt, durch die die Isomerisierung des geschlossenen  $\sigma^{54}$ /RNA-Polymerase-Komplexes in die offene Konfiguration stimuliert wird, und somit die Transkription ermöglicht (Schumacher *et al.* 2007).

### 2.3.2. *hpf*

*hpf* ist ein verhältnismäßig kurzes Gen mit nur 288 Basenpaaren und liegt direkt stromabwärts von *rpoN*. Die Funktion des Genproduktes YhbH ist unbekannt. Es ist homolog zu YfiA in *E. coli* und beide Proteine zeigen in der exponentiellen Wachstumsphase eine schwache Assoziation mit 70S-Ribosomen. In der stationären Phase hingegen interagiert YfiA stark mit den 70S-Ribosomen, während YhbH an Dimere der 100S-Ribosomen bindet (Maki *et al.* 2000).

Abweichend von der beschriebenen Expression des *rpoN*-Operons wurde eine Regulation beschrieben, in der das „*quorum sensing*“-Pheromon AI-2 eine verstärkte Expression des Gens *hpf* bewirkt (DeLisa *et al.* 2001).

### 2.3.3. *ptsN* und *npr*

Die beiden Gene *ptsN* und *npr* kodieren für Proteine, die Homologien zu Bestandteilen des kanonischen Phosphoenolpyruvat:Zucker-Phosphotransferasesystems (PTS) zeigen (Powell *et al.* 1995).

Die Aufgabe des kanonischen PTS ist die koordinierte Aufnahme von Zuckern in die Zelle. Als eine Besonderheit dieses Systems wird das Substrat während des Transports über die Zellmembran phosphoryliert, was eine direkte Einspeisung in die Glykolyse ermöglicht. Das kanonische PTS besteht aus Enzym I (EI) und HPr sowie aus verschiedenen Enzym IIs (EII), welche den eigentlichen zuckerspezifischen Transport des Substrats übernehmen und aus mehreren Domänen bestehen (Postma *et al.* 1993).

Für die Zuckeraufnahme wird zunächst ein Phosphatrest über eine Phosphorylierungskaskade von Phosphoenolpyruvat über EI auf HPr übertragen und anschließend auf die EIIA-Domäne der Permease. Von hier wird er auf die B-Domäne übertragen, welche den Zucker phosphoryliert, der über die C-Domäne aufgenommen wird.

Neben der eigentlichen Aufgabe, dem Import von Zuckern, üben die Bestandteile der Phosphorylierungskaskade weitergehende regulatorische Funktionen aus (Deutscher *et al.* 2006; Görke und Stülke 2008). Der Phosphorylierungszustand der PTS-Komponenten gibt dem regulatorischen Netz der Zelle Auskunft über die Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen.

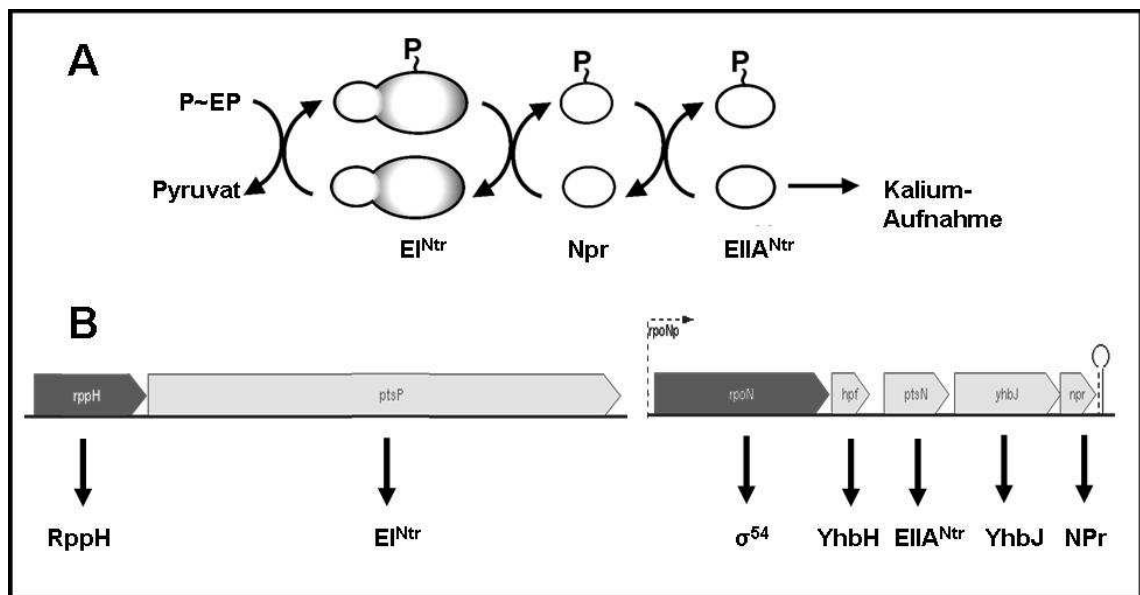
NPr stellt ein Homolog von HPr dar (Powell *et al.* 1995). Es kann durch das Protein EI<sup>Ntr</sup> (kodiert durch das Gen *ptsP*, siehe Abb. 2.2.B) phosphoryliert werden (Rabus *et al.* 1999). Zusammen mit *ptsP* ist *rppH* in diesem Operon lokalisiert. Das korrespondierende Genprodukt ist vermutlich ein Nudix-Protein, welches Dinukleotid-Oligophosphate hydrolysiert (Bessman *et al.* 2001). Diese Verbindungen wirken als sogenannte Alarmone (Kisselev *et al.* 1998) und in diesem Fall vermitteln sie eine Antwort auf Sekretionsstress (Hand und Silhavy 2003).

Das durch *ptsN* kodierte Protein ist ein Homolog der Enzym IIA-Domäne des Fruktose-spezifischen Transportkomplexes und wird als EIIA<sup>Ntr</sup> bezeichnet (Reizer *et al.* 1992). Es wird analog zur Phosphorylierungskaskade des kanonischen PTS durch NPr phosphoryliert (siehe Abb. 2.2.A). Aufgrund der Ko-Lokalisation mit  $\sigma^{54}$  wird diese Kaskade als „Stickstoff-PTS“ bezeichnet (Ntr = „nitrogen related“). Der Phosphattransfer von EI<sup>Ntr</sup> über NPr zu EIIA<sup>Ntr</sup> findet mit hoher Affinität der Komponenten zueinander statt (Rabus *et al.* 1999), jedoch wurden nennenswerte Kreuzreaktionen mit Proteinen des kanonischen PTS *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Rabus *et al.* 1999).

Es ist bekannt, dass die nicht-phosphorylierte Form des EIIA<sup>Ntr</sup> notwendig für die Aufhebung der Repression des *ilvBN*-Operons ist, dessen Genprodukte den initialen

Schritt der Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren katalysieren (Lee *et al.* 2005). Zudem zeigt eine *ptsN*-Mutante einen Wachstumsdefekt mit Intermediaten des Citratzyklus als Kohlenstoffquelle, wenn ihr gleichzeitig nur Alanin als Stickstoffquelle zur Verfügung steht (Powell *et al.* 1995).

Die dephosphorylierte Form von EIIA<sup>Ntr</sup> interagiert ferner mit TrkA, einem Transporter für Kaliumionen, und hemmt dessen Aktivität. Umgekehrt ist der Kalium-Import in einer *ptsN*-Deletion stark erhöht, wodurch die Expression des *ilvBN*-Operons inhibiert wird, in welchem die Acetohydroxysäure-Synthase I (AHAS I) kodiert ist (Lee *et al.* 2007). Dieses Enzym katalysiert den ersten Schritt der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren, und seine stark verringerte Expression ist der Grund für den Wachstumsdefekt eines  $\Delta ptsN$ -Stammes in Anwesenheit von leucinhaltenigen Peptiden (Lee *et al.* 2005). Da ein  $\Delta ptsN \Delta trkA$ -Stamm diesen Defekt nicht mehr aufweist, kann er direkt auf die Erhöhung des K<sup>+</sup>-Spiegels in der Zelle zurückgeführt werden. Die Interaktion zwischen EIIA<sup>Ntr</sup> und TrkA ähnelt der Kontrolle von Zuckerpermeasen, die nicht zum PTS gehören, durch EIIA<sup>Glc</sup> (Lee *et al.* 2007).



**Abb. 2.2.: Das „Stickstoff“-PTS in *E. coli***

(A) Schema der durch das „Stickstoff“-PTS gebildeten Phosphorylierungskaskade. Von Phosphoenolpyruvat (P~EP) wird ein Phosphatrest auf EIIA<sup>Ntr</sup> übertragen, wodurch Pyruvat entsteht. Von EIIA<sup>Ntr</sup> wird der Phosphatrest über NPr auf EIIA<sup>Ntr</sup> übertragen. Es ist kein terminaler Akzeptor für den Phosphatrest bekannt, jedoch hat der Phosphorylierungsstatus von EIIA<sup>Ntr</sup> auf die Kaliumaufnahme (siehe 2.3.3. für Details).

(B) Lokalisierung der Gene der Komponenten des „Stickstoff“-PTS. Pfeile symbolisieren Translation und führen zur Bezeichnung des korrespondierenden Genprodukts. Das Gen *ptsP*, welches für EIIA<sup>Ntr</sup> kodiert, bildet zusammen mit *rppH* ein Operon, während *npr* und das für EIIA<sup>Ntr</sup> kodierende *ptsN* Bestandteile des *rpoN*-Operons sind.

Bislang konnte kein terminaler Akzeptor der Phosphorylgruppe von EIIA<sup>Ntr</sup> identifiziert werden, und auch das Fehlen von spezifischen EIIB- und EIIC-Domänen weisen darauf hin, dass es sich bei dieser Signalkaskade um einen rein regulatorischen Vorgang handelt. Hierzu passen auch die Beobachtungen, dass die Unterbrechung des *ptsN*-Gens die letalen Effekte einer Deletion des Gens *era* aufhebt, welches für eine GTPase unbekannter Funktion codiert (Powell *et al.* 1995) sowie die zuvor beschriebene Regulation des K<sup>+</sup>-Imports. Ferner kann die Überexpression von *ptsN* die Letalität einer  $\sigma^E$ -Deletion supprimieren, wofür die phosphorylierte Form von EIIA<sup>Ntr</sup> benötigt wird (Hayden und Ades 2008).

### 2.3.4. *yhbJ*

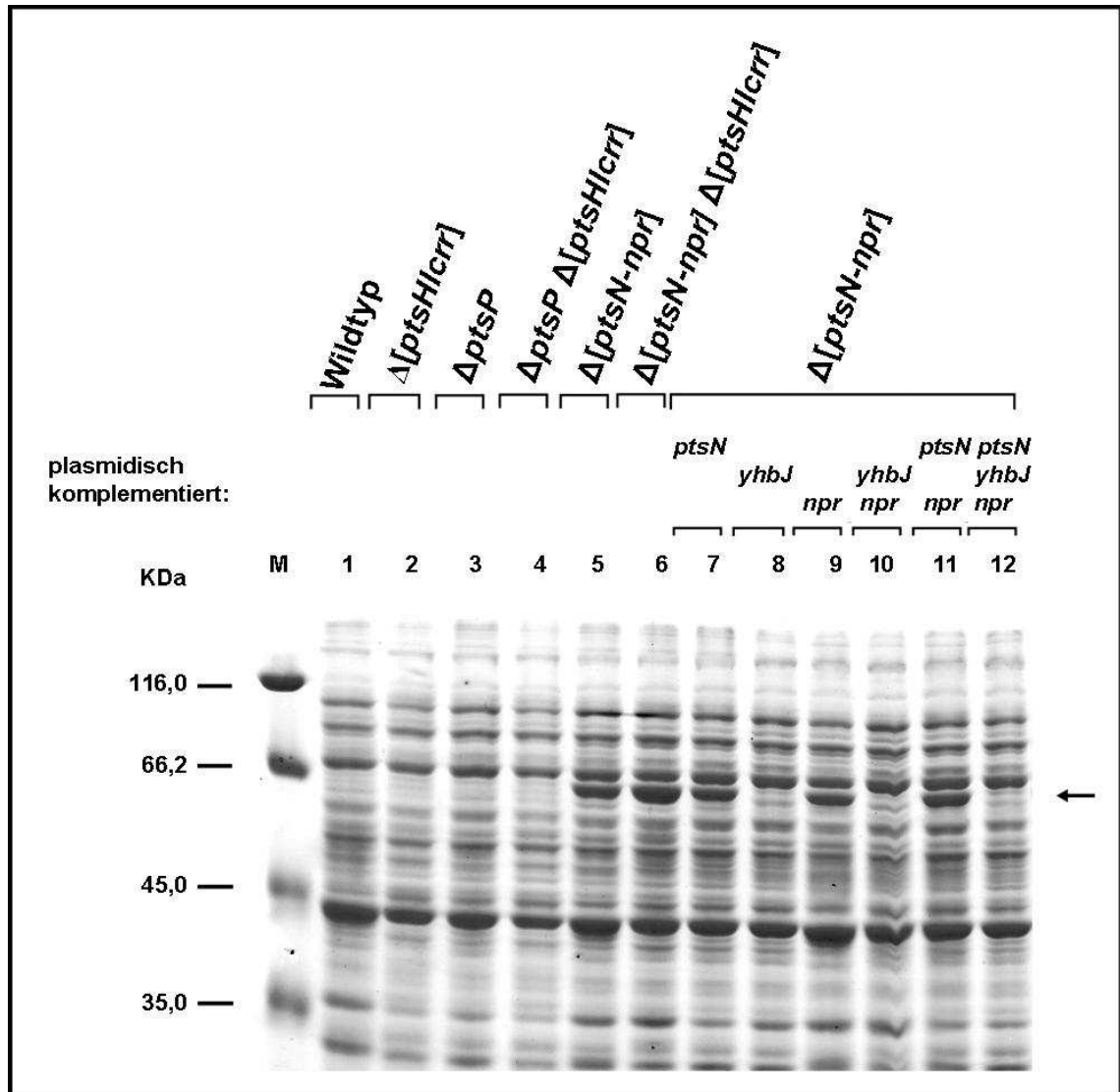
Das durch *yhbJ* kodierte Protein wurde als ATPase mit einer P-Loop-Domäne annotiert. Seine gemeinsame Lokalisation mit Komponenten des PTS ist in einem weiten Feld von Prokaryoten konserviert. In vielen Gram-negativen wie *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas putida* ist *yhbJ* zwischen *ptsN* und *npr* lokalisiert und in diesem Kontext konserviert (Deutscher *et al.* 2006). In Gram-positivem, die keine Homologe von EIIA<sup>Ntr</sup> und NPr besitzen, ist bemerkenswerter Weise die Lokalisation von *yhbJ* (hier als *yvcJ* bezeichnet) mit dem Gen eines anderen Homologs von HPr, *crh*, konserviert (Boël *et al.* 2003). Analysen der Funktion des entsprechenden *yvcIJKL-crh-yvcN*-Operon zeigten, dass *B. subtilis*  $\Delta yvcK$ -Stämme eine anormale Zellmorphologie aufweisen, sowie Defekte in der Verwertung bestimmter Kohlenstoff-Quellen (Görke *et al.* 2005).

Die genauere Analyse der Funktion YhbJ ist Bestandteil dieser Arbeit.

### 2.3.5. Die Deletion von *yhbJ* führt zu einer Akkumulation von GlmS

In vorangegangenen Arbeiten durch B. Görke, deren Ziel ursprünglich die Untersuchung der Funktion von *ptsN* und *npr* war, wurde ein Stamm generiert, der eine Deletion der Gene *ptsN*, *yhbJ* und *npr* trägt. Eine Analyse von Gesamtzellextrakten mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, siehe 3.7.6.) zeigte, dass in diesem Stamm eine starke Proteinbande mit einer Größe von etwa 65 kDa zusätzlich auftrat (Abb. 2.3. Spalte 1 und 5). Eine nachfolgende Komplementation der [*ptsN-npr*]-Deletion mit Plasmiden, die die drei Genen in allen möglichen Kombinationen tragen, zeigte dass einzig die Abwesenheit von *yhbJ* notwendige und hinreichende Bedingung

für das Erscheinen dieser Bande war. Weder die Komplementation mit *ptsN* (Spalte 7) oder *npr* (Spalte 9) noch mit einer Kombination aus beiden (Spalte 11) verhinderte das Auftreten der Bande. Im Gegensatz dazu war die Bande nicht mehr detektierbar, wenn mit einem *yhbJ*-exprimierenden Plasmid komplementiert wurde (Spalte 8, 10 und 12).



**Abb. 2.3.: Deletionsanalyse der Gene *ptsN*, *yhbJ* und *npr* in *E. coli***

Gesamtzellextrakte des Wildtyps R1279 sowie der Stämme  $\Delta[ptsHlcr]$  (R2260),  $\Delta ptsP$  (R2404),  $\Delta ptsP \Delta[ptsHlcr]$  (R2409),  $\Delta[ptsN-npr]$  (R2413),  $\Delta[ptsHlcr] \Delta[ptsN-npr]$  (R2415) sowie  $\Delta[ptsN-npr]$  transformiert mit den plasmidständigen *ptsN* (pFDX4294), *yhbJ* (pFDX4324), *npr* (pFDX4292), [*yhbJ,npr*] (pFDX4320), [*ptsN,npr*] (pFDX4322) und [*ptsN,yhbJ,npr*] (pFDX4296) wurden mittels SDS-PAGE analysiert. M = Unstained molecular weight marker.

Der Pfeil an der rechten Seite markiert eine Proteinbande von etwa 65 kDa, die nur in Abwesenheit von *yhbJ* detektierbar ist und nachfolgend als GlnS identifiziert wurde.

Abbildung nach (Kalamorz *et al.* 2007).

Desweiteren trat die Bande weder in einer Deletion der Komponenten des kanonischen PTS auf (Spalte 2), noch in einer  $EI^{Ntr}$ -Deletion (Spalte 3) oder einer Kombination dieser Deletionen (Spalte 4). In Kombination mit der Deletion des kanonischen PTS verhält sich die [*ptsN-npr*]-Deletion dominant (Spalte 5).

Somit konnte festgestellt werden, dass weder die Bestandteile des kanonischen PTS noch die des „Stickstoff“-PTS einen Einfluss auf das Erscheinen dieser Proteinbande haben, und dieses einzig von der Abwesenheit von *yhbJ* abhängt (Kalamorz *et al.* 2007).

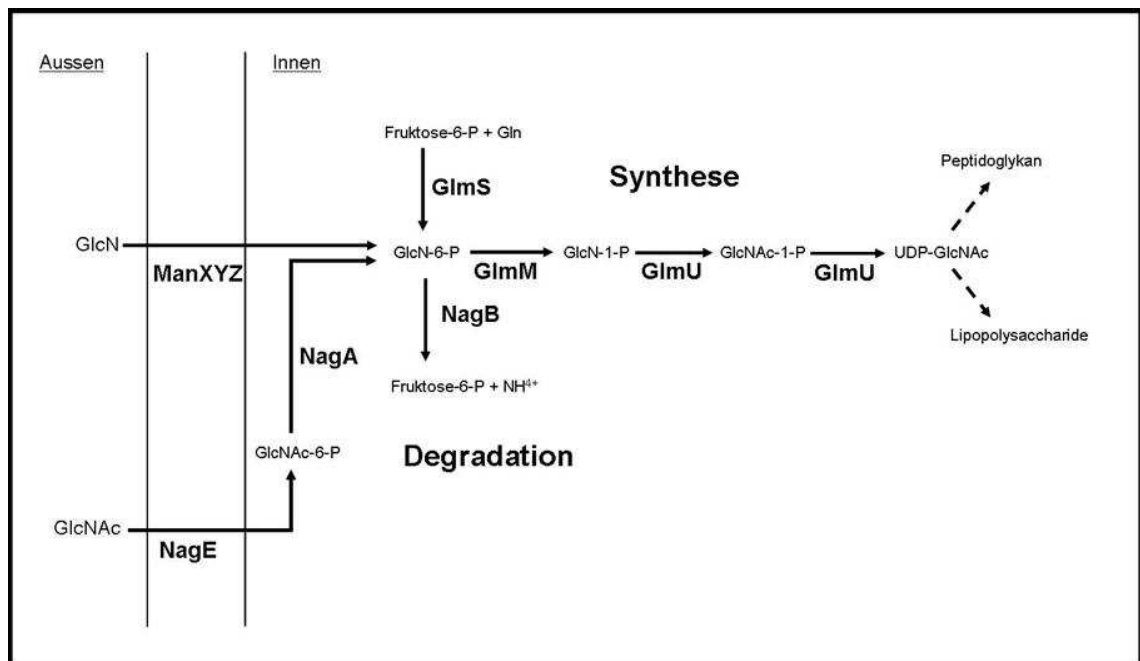
Das korrespondierende Protein wurde extrahiert und mittels massenspektrometrischer Analyse als Glukosamin-6-Phosphat-Synthase GlmS identifiziert.

### **2.4. Aminosucker-Metabolismus**

#### 2.4.1. Die Glukosamin-6-Phosphat Synthase GlmS

Aminosucker sind essentielle Bausteine für die Synthese des Peptidoglykans der Zellhülle und der Lipopolysaccharide der äußeren Membran.

Der anabole und katabole Metabolismus von Aminosuckern ist in Abbildung 2.4. dargestellt. Das zentrale Intermediat dieses Stoffwechselweges ist Uridin-5'-diphospho-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc). In *E. coli* ist der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der *de novo*-Synthese von UDP-GlcNAc die Generierung von Glukosamin-6-Phosphat (GlcN-6-P) aus Glutamin und Fruktose-6-Phosphat, wobei als Nebenprodukt Glutamat entsteht (Milewski 2002; Teplyakov *et al.* 2002). Dieser Schritt wird durch die Glukosamin-6-Phosphat Synthase GlmS katalysiert und besteht aus zwei gekoppelten enzymatischen Reaktionen: Der Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und Ammonium (welches nachfolgend auf das Fruktose-6-Phosphat übertragen wird), sowie die Isomerisierung von Fruktose-6-Phosphat von einer Ketose in eine Aldose (Milewski 2002). GlcN-6-P wird im Folgenden durch die Phosphoglukosamin-Mutase GlmM in D-Glukosamin-1-Phosphat umgewandelt, welches dann von der bifunktionalen N-Acetylglukosamin-1-Phosphat Uridyltransferase / Glukosamin-1-Phosphat Acetyltransferase GlmU zu UDP-GlcNAc umgesetzt wird (Mengin-Lecreulx und van Heijenoort 1993; Mengin-Lecreulx und van Heijenoort 1994; Mengin-Lecreulx und van Heijenoort 1996).



**Abb. 2.4.: Aminosucker-Metabolismus in *E. coli***

Die beiden Linien links symbolisieren die Zellmembran. „Innen“ bezeichnet das Cytoplasma, „Aussen“ die Umgebung jenseits der Zellhülle. Glukosamin (GlcN) und N-Acetylglukosamin (GlcNAc) können über die Transporter ManXYZ und NagE aufgenommen werden, wobei das Substrat phosphoryliert wird. N-Acetylglukosamin-6-Phosphat (GlcNAc-6-P) wird nachfolgend durch NagA zu Glukosamin-6-Phosphat (GlcN-6-P) umgesetzt. Dieses wird entweder zur Synthese von Peptidoglykan oder Lipopolysacchariden verwendet oder als Kohlenstoffquelle verstoffwechselt. In diesem Fall wird es durch NagB in Ammonium und Fruktose-6-P gespalten, welches in der Glykolyse abgebaut werden kann.

Falls keine externe Quelle für Aminosucker zur Verfügung steht, ist *E. coli* in der Lage, GlcN-6-P mittels GlmS aus Fruktose-6-P und Glutamat zu synthetisieren.

GlcN-1-P= Glukosamin-1-Phosphat, GlcNAc-1-P= N-Acetylglukosamin-1-Phosphat, UDP-GlcNAc= Uridin-5'-diphospho-N-Acetylglukosamin.

Abbildung nach (Plumbridge 1995).

Die Gene *glmM* und *glmU* sind essentiell für *E. coli*, während *glmS* nur dann notwendig für das Überleben der Zelle ist, wenn keine externe Quelle für Aminosucker verfügbar ist. N-Acetylglukosamin (GlcNAc), Glukosamin (GlcN) und weitere Aminosucker wie Chitobiose und Sialinsäure können von der Zelle aufgenommen und zu GlcN-6-P umgewandelt werden, wodurch der von GlmS katalysierte Syntheseschritt umgangen werden kann (Plumbridge und Vimr 1999).

GlmS besteht aus einer N-terminalen Glutaminase-Domäne und einer C-terminalen Isomerase-Domäne, und bildet Homodimere (Badet *et al.* 1987). Der Mechanismus der Glc-6-P-Synthese ist beschrieben (Teplyakov *et al.* 2002; Mouilleron *et al.* 2006) und die Kristallstrukturen des Proteins sowie von Protein-Substrat-Komplexen sind aufgeklärt (Isupov *et al.* 1996; Teplyakov *et al.* 1998; Teplyakov *et al.* 2001). Es sind mehrere Inhibitoren von GlmS bekannt, darunter Bacilysin (Kenig und Abraham 1976; Chmara *et al.* 1984), FMDP (Marshall *et al.* 2003) und reaktive Intermediat-Analoga (Bearne und Blouin 2000). Ebenso wurde eine Inhibition der enzymatischen Aktivität

von GlmS durch Glukosamin und GlcN-6-P *in vitro* beschrieben (White 1968; Teplyakov *et al.* 2001), jedoch sind die benötigten Konzentrationen sehr hoch und die physiologische Bedeutung dieses Effektes wird angezweifelt, da GlcN-6-P in der Zelle sehr schnell zu GlcN-1-P umgesetzt wird (Milewski 2002). Da die Menge des durch GlmS synthetisierten GlcN-6-P pro Generationszeit lediglich 2-3fach höher ist als die für die Peptidoglykanherstellung benötigte Menge, ist GlmS ein attraktives Ziel für die Entwicklung antimikrobieller Wirkstoffe (Teplyakov *et al.* 2002).

### 2.4.2. Kataboler Abbau von Glukosamin-6-P

Sollte *E. coli* eine externe Quelle für Aminozucker angeboten werden, so ist es in der Lage, diese Verbindungen aufzunehmen und als Kohlenstoffquelle zu verstoffwechseln (siehe Abb. 1.4.). Hierbei wird das Substrat über PTS-Transporter aufgenommen und phosphoryliert (Postma *et al.* 1993). Der Transport von Glukosamin erfolgt durch den ManXYZ-Komplex, während GlcNAc durch das Protein NagE, einem EnzymIIABC-Protein des PTS, importiert wird. Das so entstehende N-Acetyl-Glukosamin-6-Phosphat (GlcNAc-6-P) wird zunächst durch die GlcNAc-6-P Deacetylase NagA in GlcN-6-P umgesetzt. Nachfolgend wird dieses durch Isomerisation und Deaminierung, katalysiert durch die GlcN-6-P Deaminase NagB, in Fruktose-6-Phosphat umgewandelt (Alvarez-Anorve *et al.* 2005). Die hierzu notwendigen Proteine sind im divergenten *nagE-nagBACD*-Operon codiert, dessen Expression unter Kontrolle des Regulators NagC steht. NagC wirkt als Repressor der *nagE-nagBACD*-Expression, indem es an Operator-Sequenzen bindet, die mit den Promotoren der beiden Operons überlappen (Plumbridge 1991). Diese Bindung induziert die Ausbildung einer Schleife in der DNA, wodurch die Transkription der Gene verhindert wird (Plumbridge *et al.* 1993). In Anwesenheit einer externen Aminozuckerquelle wird GlcNAc-6-P gebildet, welches als Effektor an NagC binden kann und die DNA-Bindefähigkeit des Proteins aufhebt. Die Repression der *nag*-Gene wird aufgehoben und der katabole Metabolismus für Aminozucker wird aktiviert. Zusätzlich dient GlcNAc-6-P als allosterischer Aktivator der NagB-Aktivität (Midelfort und Rose 1977).

Zusätzlich reprimiert NagC die Expression des *chbBCARFG*-Operons, dessen Produkte den Abbau von Chitobiose katalysieren, einem Disaccharid aus zwei GlcNAc-Einheiten (Plumbridge und Pellegrini 2004).



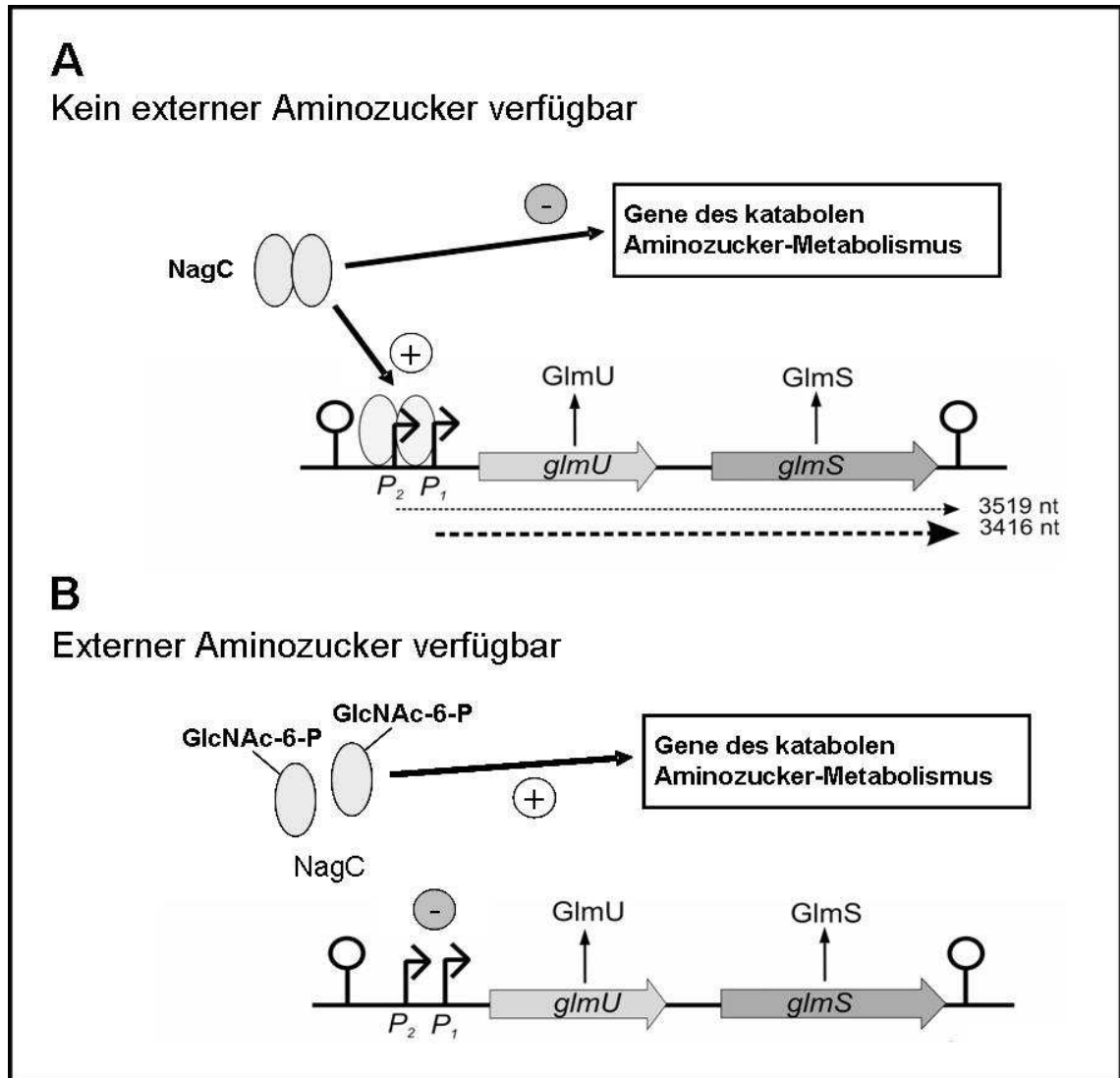
### 2.4.3. Regulation des *glmUS*-Operons durch NagC

Da in *E. coli* ein anaboler und ein kataboler Metabolismus für Aminosucker besteht, muss deren Aktivität präzise ausbalanciert sein, so dass keine nutzlosen Zyklen aus Synthese und Degradation entstehen, die als „Kurzschluß“-Reaktion der Zelle Energie entziehen. Einer der einfachsten Wege, eine solche Kontrolle auszuüben ist die Einrichtung eines „Schalters“, der immer nur die Aktivität eines der beiden Wege zulässt, also einen der Wege aktiviert und/oder den anderen inhibiert.

Die Gene für zwei der Enzyme des UDP-GlcNAc-Syntheseweges, GlmS und GlmU, sind zusammen in einem Operon codiert, welches von zwei Promotoren vor *glmU* aus exprimiert wird. Diese beiden Promotoren (P1 und P2) stehen unter Kontrolle des DNA-bindenden Proteins NagC (Plumbridge 1995), welches ebenfalls die Expression des *nag*- und *chb*-Operons reguliert, die für die Proteine des katabolen Abbaus von Aminosuckern codieren (siehe 2.4.2.), sowie in *E. coli* auch die Expression von *galP*, welches die Galactose-Permease kodiert (El Qaidi *et al.* 2008).

Die Regulation der beiden *glmU*-Promotoren durch NagC ist komplex: Der Regulator bindet an zwei Operator-Sequenzen stromaufwärts der Promotoren und wirkt dort als Aktivator von P1, jedoch zur selben Zeit als Repressor für P2. Dies resultiert in einer lediglich 3-fach höheren Expression wenn NagC an die Operator-Sequenzen gebunden ist, verglichen mit einem Faktor von 40 in der NagC-abhängigen Regulation des *nagBACD*-Operons (Plumbridge *et al.* 1993; Plumbridge 1995). Im Gegensatz zu diesen Genen ist zumindest *glmU* ein unter allen Wachstumsbedingungen essentielles Gen in *E. coli*, was eine Erklärung für eine hohe Expression auch unter nicht-aktivierenden Bedingungen ist. Die Aktivität von NagC ist durch GlcNAc-6-P reguliert: Als Effektor ist es in der Lage, an NagC zu binden und moduliert dessen Fähigkeit zur DNA-Bindung (Plumbridge *et al.* 1993). Dadurch wird die Synthese der anabolen und katabolen Proteine des Aminosucker-Metabolismus an die Verfügbarkeit einer externen Quelle gekoppelt: Bei Anwesenheit von Aminosuckern in der Umgebung werden diese über NagE aufgenommen und in GlcNAc-6-P umgesetzt. Dieses interagiert mit NagC und inhibiert dessen Fähigkeit zur Bindung an die Operatorsequenzen (siehe Abb. 2.5.B). Dadurch wird gleichzeitig die Repression des *nagBACD*-Operons aufgehoben und der aktivierende Einfluss von NagC auf die *glmU*-Promotoren beendet (Plumbridge 1995). Sollten keine externen Aminosucker mehr verfügbar sein, so kann NagC wieder an die DNA binden, wodurch die Expression der katabolen Proteine wieder reprimiert

wird. Zusätzlich wird die Expression der Enzyme zur *de novo*-Synthese verstärkt (siehe Abb. 2.5.A).



**Abb. 2.5.: NagC-abhängige Regulation der Expression kataboler und anaboler Gene des Aminosucker-Metabolismus in *E. coli***

(A) Wenn keine externe Quelle für Aminosucker zur Verfügung steht, bindet NagC an seine Operatorsequenzen. Hier wirkt es als Repressor der Expression der Gene des katabolen Aminosucker-Metabolismus, während es die Expression der anabolen Gene *glmU* und *glmS* aktiviert.

(B) Sobald eine externe Quelle für Aminosucker verfügbar wird, interagiert GlcNAc-6-P mit NagC und dieses verliert seine Fähigkeit zur Bindung an die DNA. Dadurch wird der aktivierende Effekt auf die *glmUS*-Expression aufgehoben, ebenso wie die Repression der Expression der Gene des katabolen Aminosuckermetabolismus

#### 2.4.4. Regulation von GlmS in *B. subtilis* und in Eukaryoten

Das *glmUS*-Operon kodiert sowohl die essentielle N-Acetylglukosamin-1-Phosphat Uridyltransferase / Glukosamin-1-Phosphat Acetyltransferase GlmU, die unter allen Wachstumsbedingungen für die Umwandlung von Glukosamin-1-Phosphat zu UDP-

GlcNAc notwendig ist, sowie die Glukosamin-6-Phosphat Synthase GlmS, die die *de novo*-Synthese von GlcN-6-P aus Fructose-6-Phosphat und Glutamin katalysiert, ein Schritt, der nur notwendig ist, wenn keine externe Quelle für Aminozucker zur Verfügung steht. Dies führt zu der Frage, ob die Synthese oder Aktivität von GlmS einer weiteren Regulation unterliegt, da eine synchrone Expression mit GlmU unter bestimmten Umständen dazu führen würde, dass trotz einer ausreichenden Versorgung durch externe Aminozucker die *de novo*-Syntheserate von GlcN-6-P erhöht wird. Dies würde der Zelle jedoch unnötig die zentralen Stoffwechselprodukte Fructose-6-Phosphat und Glutamin entziehen.

In eukaryotischen Organismen unterliegt die Aktivität von GlmS einer starken allosterischen Hemmung durch UDP-GlcNAc, dem zentralen Intermediat stromabwärts im Syntheseweg (Milewski 2002). Ebenso wurde eine starke Hemmung des menschlichen Homologs GFAT1 durch Glukosamin-6-Phosphat (Broschat *et al.* 2002) beobachtet.

Darüber hinaus ist bekannt, dass die Translation des *glmS*-Transkripts in Gram-positiven Organismen wie *Bacillus subtilis* von einem Ribozym kontrolliert wird. Dieses ist ein in *cis*-wirkendes regulatorisches RNA-Element in der nicht-translatierten 5'-Region des *glmS*-Transkriptes. Das *glmS*-Ribozym ist bislang einzigartig: Im Gegensatz ähnlichen regulatorischen Elementen handelt es sich bei diesem Mechanismus nicht um eine Attenuationskontrolle der Translation, sondern um eine Metaboliten-vermittelte Selbstspaltung der RNA (Winkler *et al.* 2004). Hierbei bindet GlcN-6-P an die Sekundärstruktur nahe der Spaltstelle (Jansen *et al.* 2006) und dient als Koenzym der Spaltung (McCarthy *et al.* 2005). Im Gegensatz zu *Riboswitches* kommt es bei dem *glmS*-Ribozym bei Bindung des Substrates nicht zu dramatischen Änderungen der Sekundärstruktur, sondern diese löst lediglich die Spaltung des Primärtranskriptes aus (Tinsley *et al.* 2007). Die Spaltung durch das Ribozym generiert RNA-Produkte mit einem zyklischen 2'-3'-Phosphat und einer 5'-Hydroxylgruppe (Cochrane und Strobel 2008). Die Stabilität des *glmS*-spezifischen Spaltproduktes ist gegenüber dem Primärtranskript herabgesetzt, und es wurde gezeigt, dass RNA mit 5'-Hydroxylgruppen spezifisch durch RNase J1 abgebaut wird (Collins *et al.* 2007).

In *E. coli* ist RNase E verantwortlich für den mRNA-Abbau, jedoch fehlt *B. subtilis* ein entsprechendes Homolog. Interessanterweise zeigt diese ein der RNase J1 entgegengesetztes Verhalten: RNase E-abhängige Degradation zeigt gegenüber RNAs mit 5'-Hydroxylgruppe die geringste Affinität (Celesnik *et al.* 2007).

Demnach wird die Aktivität der Glukosamin-6-Phosphat Synthase sowohl in Eukaryoten wie auch in Gram-positiven Mikroorganismen direkt oder indirekt durch stromabwärts gelegenen Intermediate des Syntheseweges inhibiert.

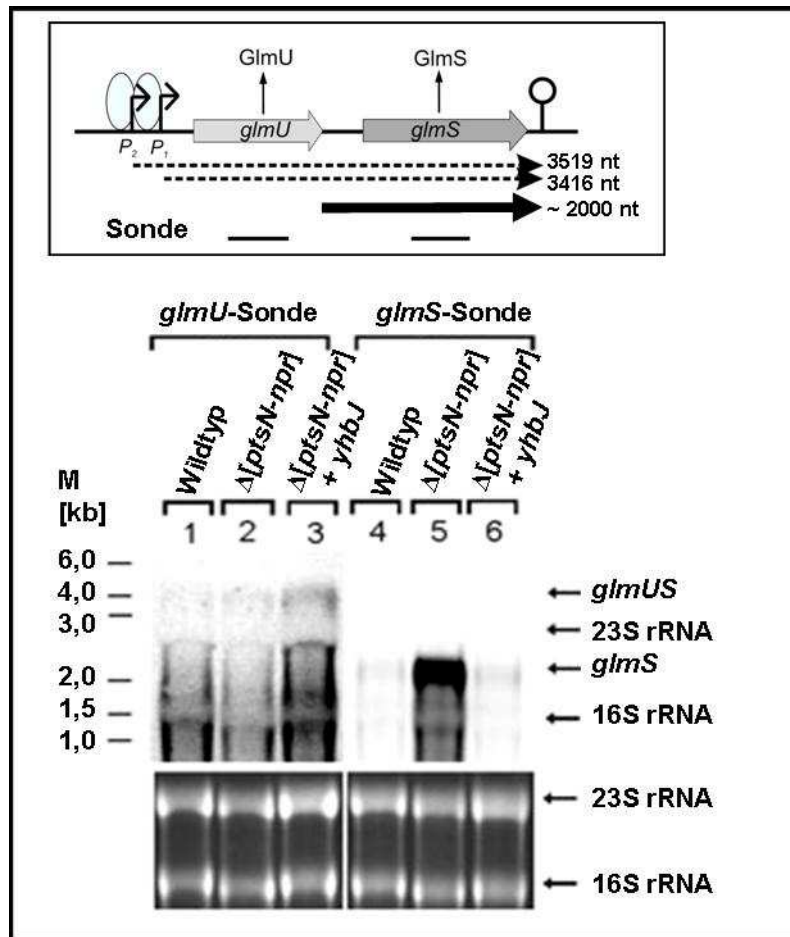
In *E. coli* ist zwar *in vitro* ein inhibierender Effekt von Glukosamin und GlcN-6-P beschrieben, jedoch findet dieser nur bei Konzentrationen statt, die außerhalb des physiologisch zu erwartenden Bereiches im Inneren der Zell liegen, und der zugrunde liegende Mechanismus ist unklar (Milewski 2002).

### 2.4.5. YhbJ-abhängige Regulation der *glmS*-Expression durch Stabilisierung einer *glmS*-spezifischen mRNA

Um die Hypothese eines regulatorischen Ereignisses stromabwärts der bekannten Promotoren vor *glmU* zu untersuchen, wurden Northern Blot Analysen von Gesamt-RNA-Proben des Wildtyps (R1279) und eines  $\Delta[ptsN-npr]$ -Stammes (R2413), sowie des  $\Delta[ptsN-npr]$ -Stammes transformiert mit einem *yhbJ*-tragenden Plasmid (pFDX4324) durchgeführt (siehe 3.6.7), bei denen Sonden gegen *glmU* und *glmS* verwendet wurden (siehe Abb. 2.6., Arbeiten von B. Reichenbach in (Kalamorz *et al.* 2007)).

Mit der Sonde gegen *glmU* konnte ein schwaches Signal mit einer Größe von 3,5 kB detektiert werden, welches einem Transkript des gesamten *glmUS*-Operons entspricht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Stämmen und der Transformante beobachtet werden (Abb 2.6., Spur 1-3). Die geringe Menge an *glmUS*-Transkript beruht auf einer hohen Instabilität der mRNA (Joanny *et al.* 2007). Dies erklärt auch das undeutliche Signal unter der Bande des Transkriptes, welches auf Abbauprodukten der mRNA zurückzuführen ist.

Im Gegensatz hierzu ist mit einer gegen *glmS* gerichteten Sonde in der  $[ptsN-npr]$ -Deletion ein auffälliges und sehr starkes Signal für eine RNA mit einer Größe von etwa 2 kB detektierbar (Abb. 2.6., Spur 5), das im Wildtyp nicht vorhanden ist (Abb. 2.6., Spur 4). Wird die  $[ptsN-npr]$ -Deletion mit *yhbJ* auf einem Plasmid komplementiert, ist das zusätzliche Transkript ebenfalls nicht detektierbar (Abb. 2.6., Spur 6). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass in Abwesenheit von YhbJ die Menge eines *glmS*-spezifischen Transkriptes stark ansteigt. Vergleicht man die Größe des *glmS*-spezifischen Signals mit der Operon-Struktur, so ist anzunehmen, dass das korrespondierende Transkript seinen Startpunkt im 3'-Bereich des *glmU*-Gens oder im 5'-Bereich des intergenischen Bereiches zwischen *glmU* und *glmS* hat.



**Abb. 2.6.: Northern Blot Analysen mit Sonden gegen *glmU* und *glmS***

(A) Schematische Darstellung des *glmUS*-Operons. Pfeile symbolisieren die in der Northern Blot Analyse detektierten Transkripte. Die beiden Balken markieren die Bereiche, zu denen die Sonden komplementär sind.

(B) Ergebnisse der Northern Blot Analysen. Gesamt-RNA des Wildtyps (R1279), eines  $\Delta[ptsN-npr]$ -Stammes (R2413) sowie des  $[ptsN-npr]$ -Stammes transformiert mit einem Plasmid, das *yhbJ* unter  $P_{tac}$ -Kontrolle trägt (pFDX4324) wurde präpariert und in einer Northern Blot Analyse (siehe 3.6.7.) eingesetzt. Die Spuren 1-3 zeigen die detektierten Signale bei Verwendung einer gegen *glmU* gerichteten Sonde. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Stämmen erkennbar.

In den Spuren 4-6, in denen eine gegen *glmS* gerichtete Sonde verwendet wurde, ist ein zusätzliches Transkript einer Größe von etwa 2000 Basen detektierbar. Dieses tritt nur in dem  $[ptsN-npr]$ -Deletionsstamm auf, und verschwindet bei Komplementation mit plasmidständigen *yhbJ*.

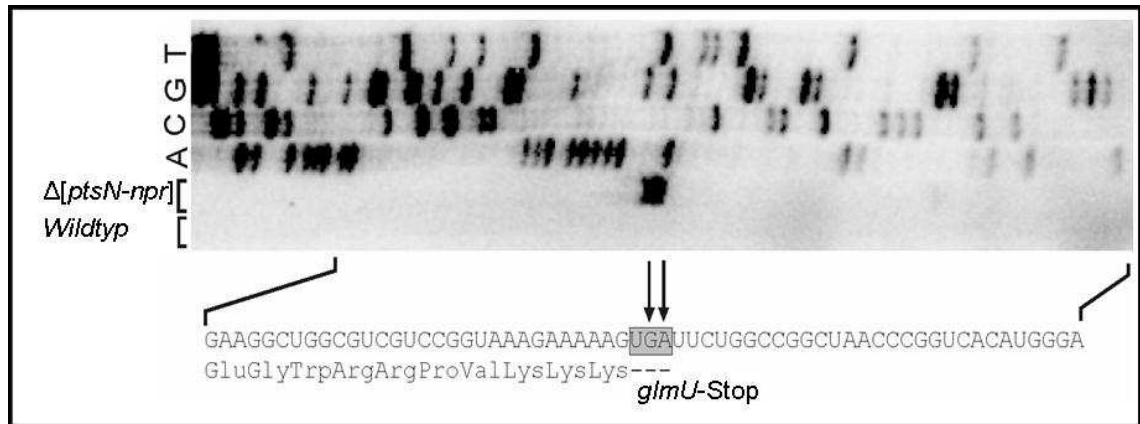
Zu beachten ist in diesem Zusammenhang, dass die gegen *glmS* gerichtete Sonde in einer 10fach niedrigeren Konzentration eingesetzt wurde als die gegen *glmU* gerichtete, weshalb das Primärtranskript von 3500 Basen nicht detektiert werden kann.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die erhöhte GlmS-Menge in Abwesenheit von *yhbJ* auf dem Auftreten eines zusätzlichen, *glmS*-spezifischen Transkriptes beruht.

Abbildung nach (Kalamorz *et al.* 2007).

Dies konnte durch Messungen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (siehe 3.3.4.) mit plasmidischen *glmU*-, *glmUS*- und *glmS-lacZ*-Reporterfusionen bestätigt werden. Die Anwesenheit von YhbJ hat keinen Effekt auf eine *glmU-lacZ*-Reporterfusion. Sobald jedoch der intergenische Bereich zwischen *glmU* und *glmS* in der Reporterfusion vorhanden ist, zeigt diese eine erhöhte Aktivität in Abwesenheit von YhbJ (vergleiche Abb. 4.1. und (Kalamorz *et al.* 2007)).

Um den Startpunkt des *glmS*-spezifischen Transkriptes zu lokalisieren wurden *Primer Extension*-Experimente durchgeführt (Arbeiten von Walter März und Bodo Rak in (Kalamorz *et al.* 2007). Hierbei wurde festgestellt, dass das 5'-Ende des *glmS*-spezifischen Transkriptes mit dem G beziehungsweise A des Stop-Codons von *glmU* übereinstimmt (siehe Abb. 2.7). Dieses Transkript war auch hier ausschließlich in Abwesenheit von YhbJ zu beobachten. Interessanterweise ergab eine Analyse der direkt stromaufwärts gelegenen DNA-Sequenz keinerlei Hinweise auf einen zusätzlichen Promotor.



**Abb. 2.7.: Primer Extension-Experiment zur Lokalisation des Startpunktes des *glmS*-spezifischen Transkriptes in *E. coli*.**

Gesamt-RNA des Wildtyps (R1279) und eines  $\Delta[ptsN-npr]$ -Stammes (R2413) wurde präpariert und für *Primer Extension*-Experimente eingesetzt. Es wurde hierbei ein Oligonukleotid verwendet, das komplementär zu einer Sequenz stromaufwärts vom *glmS*-Startpunkt ist. Die Reaktionsprodukte wurden zusammen mit einer Sequenzierungsleiter (A, C, G, T), welche unter Verwendung desselben Oligonukleotids generiert wurde, in einem Harnstoff/Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und analysiert.

Es ist kein Signal im Wildtyp-Stamm detektierbar. Im Gegensatz dazu treten im  $\Delta[ptsN-npr]$ -Stamm zwei deutliche Signale auf. Die Startpunkte dieser *glmS*-spezifischen Transkripte stimmen mit dem G beziehungsweise A des Stopcodons des Gens *glmU* überein.

Abbildung nach (Kalamorz *et al.* 2007).

Ein vergleichbares Auftreten eines *glmS*-spezifischen Transkriptes wurde für Stämme beschrieben, in denen das Gen *pcnB* deletiert ist, welches für die Poly(A)-Polymerase PAP I codiert. In diesem Fall konnte gezeigt werden, dass dieses *glmS*-spezifische Transkript durch eine RNase E-abhängige Prozessierung des *glmUS*-Primärtranskriptes entsteht (Joanny *et al.* 2007).

## 2.5. Fragestellung der Arbeit

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die verstärkte Expression von *glmS* in Abwesenheit von YhbJ auf der Akkumulation eines *glmS*-spezifischen Transkriptes beruht, sollte nun zunächst mittels Transposon-Mutagenese nach weiteren Genen gesucht werden, deren Produkte an dieser Regulation beteiligt sind. Falls solche zusätzlichen Komponenten identifiziert werden können, soll ihre Funktion in der Regulation nachfolgend näher untersucht werden.

Die Akkumulation der *glmS*-spezifischen mRNA konnte bislang nur in der artifiziellen Situation eines *yhbJ*-Deletionsstammes beobachtet werden. Um die physiologische Rolle des regulatorischen Ereignisses aufzuklären soll das Signal identifiziert werden, welches diesen Mechanismus im Wildtyp aktiviert.

Aufgrund der zentralen Rolle von YhbJ in der Kontrolle der *glmS*-Expression soll dieses Protein näher charakterisiert werden. Hierzu soll die Expression von *yhbJ* als Teil des *rpoN*-Operons untersucht, Mutanten von YhbJ durch Aminosäure-Austausche und Deletionen generiert und analysiert sowie ein möglicher globaler Einfluss einer *yhbJ*-Deletion durch MicroArray Analysen bestimmt werden.

Sollten in der oben genannten Transposon-Mutagenese weitere Komponenten des Regulationsmechanismus identifiziert werden, so soll eine mögliche Interaktion mit YhbJ untersucht werden.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Stämme, Plasmide und Oligonukleotide**

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme, Plasmide und Oligonukleotide sind im Anhang in den Tabellen 7.1., 7.2. und 7.3. aufgeführt.

### **3.2. Medien und Antibiotika**

Puffer, Lösungen und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, mit H<sub>2</sub>O (bidest) angesetzt und 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Thermolabile Substanzen wurden gelöst und mittels FP 30/0,2 CA-S Filtern (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) sterilfiltriert.

#### **3.2.1. Luria Bertani (LB) -Medium**

LB-Medium:

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O (dest)	ad 1.000 ml

Dem Grundmedium wurde bei der Herstellung von Plattenmedien zur Verfestigung 15 g/l Agar zugesetzt.

#### **3.2.2. M9-Minimalmedium**

M9 (20 ×):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	140 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 g
NH <sub>4</sub> Cl	20 g
H <sub>2</sub> O (dest)	ad 1.000 ml



M9-Medium (Minimal-Medium):

M9	(20 ×)	50 ml
MgSO <sub>4</sub>	[1 M]	1 ml
CaCl <sub>2</sub>	[0.1 M]	1 ml
FeCl <sub>3</sub>	[1 mM]	0.5 ml
L-Prolin	[4 mg/ml]	10 ml
Thiamindichlorid	[1 mg/ml]	1 ml
Kohlenstoffquelle		1 % [w/v]
H <sub>2</sub> O (dest)		ad 1.000 ml

M9-Minimalmedium wurde aus sterilen Lösungen angesetzt und nicht autoklaviert.

Zur Herstellung von M9-Plattenmedium wurde zunächst 3% (w/v) Bacto-Agar in einem Volumen entsprechend der Hälfte des gewünschten Endvolumens autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 60°C mit den oben genannten Bestandteilen des M9-Mediums komplementiert und zum gewünschten Endvolumen aufgefüllt.

3.2.3. SOB/SOC – Medium

SOB-Medium:

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
KCl (3M)	834 µl
H <sub>2</sub> O (dest)	ad 1.000 ml
pH 7,0 einstellen mit HCl	

Nach dem autoklavieren 2 ml MgCl<sub>2</sub> (1 M) zugeben.

SOC-Medium:

SOC-Medium wurde zunächst wie SOB angesetzt, jedoch nach dem autoklavieren zusätzlich mit 19,8 ml Glukose (10% (w/v)) pro Liter supplementiert

#### 3.2.4. McConkey/Lac – Plattenmedium

McConkey-Agar	40 g
Lactose	10 g
H <sub>2</sub> O (dest)	ad 1.000 ml

#### 3.2.5. Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden als 1.000fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Nva-FMDP, Ampicillin und Kanamycin wurden dazu in H<sub>2</sub>O (bidest) gelöst, Tetracyclin, Chloramphenicol und Fosfomycin in 70% Ethanol (reinst), N-Ethylmaleimid in 20% DMSO. Alle Lösungen wurden steril filtriert und bei -20°C oder 4°C bewahrt.

Die Antibiotika wurden den Medien entweder nach dem Abkühlen auf etwa 50°C oder direkt vor Gebrauch zu den angegebenen Endkonzentrationen zugegeben.

Selektionskonzentration für *E. coli*:

Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	15 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/ml

#### 3.2.6. Weitere Medienzusätze

Neben Antibiotika wurden ebenfalls folgende Chemikalien zur Komplementation von Medien eingesetzt:

X-Gal	50 µg/ml
IPTG	0,1 - 1 mM
L-Arabinose	20 mM oder 0,2% (w/v)

### 3.3. Mikrobiologische Methoden

#### 3.3.1. Anzucht und Konservierung von Bakterien

*E. coli* wurde, wenn nicht anders erwähnt, in LB-Medium (siehe 3.2.1.) bei 37°C und 180 rpm auf einem Horizontalschüttler in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben kultiviert. Die Inokulation erfolgte mit Einzelkolonien von frischen Vereinzlungsplatten oder aus Übernachtskulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm mit Hilfe eines V-530 UV/VIS Spectrophotometers (Fa. Jasco, Gotha) oder einem Ultrospec 2100 pro-Photometers (Fa. Amersham, Freiburg) verfolgt.

Zur langfristigen Lagerung wurden Kulturen bei -70°C aufbewahrt. Hierzu wurde 1 ml einer spätlogarithmischen oder stationären Kultur mit 80 µl DMSO versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### 3.3.2. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* (Hanahan 1983)

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mittels der Calciumchlorid-Methode hergestellt. Hierzu wurden 25 ml LB-Medium (siehe 3.2.1.) in einem 300 ml-Erlenmeyerkolben aus einer Übernachtskultur zu einer OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert und bei 37°C auf einem Horizontalschüttler bei 180 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,3 inkubiert. Dann folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 4.000 rpm in einem Heraeus #75007590-Rotor (Kendro Laboratory Products, Langenselbold). Das Pellet wurde in 10 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert, bevor die beschriebene Zentrifugation wiederholt wurde. Das Pellet wurde in 500 µl 0,1 M CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und zur Transformation eingesetzt.

Alternativ wurden sogenannte super-kompetente Zellen hergestellt. Hierzu wurden zunächst 5 ml LB-Medium (siehe 3.2.1.) mit dem gewünschten Stamm inokuliert und über Nacht bei 37°C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden dann 250 ml SOB-Medium (siehe 3.2.3.) in einem 1 l-Schikanekolben inokuliert und in einem Wasserbad bei 18°C unter Agitation inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde (etwa 24 h). Die Kultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und die Zellen anschließend bei 4.000 rpm und 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 ml TB aufgenommen. Es folgte eine Inkubation

für 10 min auf Eis, danach wurden die Zellen wiederum bei 4.000 rpm und 4°C für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 20 ml TB resuspendiert und auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 1,5 ml DMSO wurde der Ansatz zu je 200 µl in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert, die dann in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert wurden.

TB :

PIPES	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
KCl	250 mM
pH 6,7 einstellen mit HCl	

Nach dem Autoklavieren sterilfiltriertes MnCl<sub>2</sub> zu einer Konzentration von 45 mM zugeben.

### 3.3.3. Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis mit 10-100 ng Plasmid in 50 µl TEN-Puffer in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt und der Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch für 90 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium zunächst für 1 min auf Eis gekühlt und anschließend in ein steriles Reagenzglas überführt. Dieses wurde für 60 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Von den Transformationsansätzen wurden jeweils 100 µl und der abzentrifugierte Rest auf entsprechenden LB-Selektionsagar ausplattiert.

TEN pH 8,0:

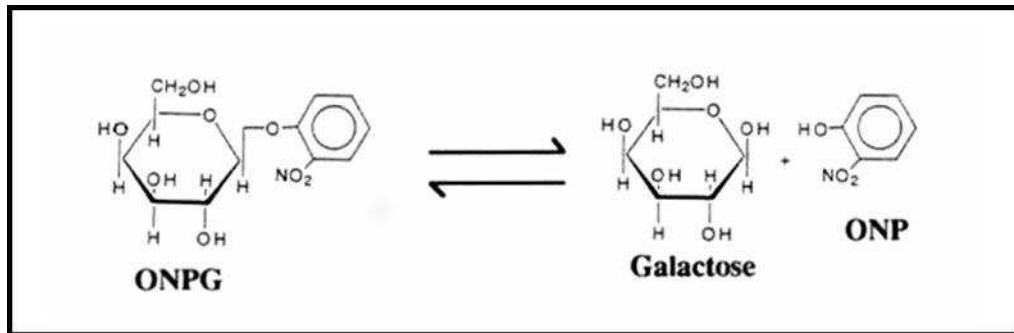
Tris-HCl	20 mM
EDTA	1 mM
NaCl	50 mM

### 3.3.4. β-Galaktosidase-Assay (Miller 1972)

Die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität ist ein klassisches Reporteragen-Assay, das zur indirekten Bestimmung der Expressionsstärke beziehungsweise Translationseffizienz eines Genes verwendet wird. Die Messung beruht auf der

enzymatischen Umwandlung von *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG) in Galaktose und *o*-Nitrophenol durch die  $\beta$ -Galaktosidase (siehe Abb. 3.1.). *o*-Nitrophenol ist ein gelber Farbstoff und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm quantitativ bestimmt werden.

Der zu testende Stamm oder die zu testende Transformante wurde zunächst über Nacht in 5 ml des Testmediums auf dem Horizontalschüttler bei 37°C inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 10 ml des Testmediums zu einer OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert und auf dem Horizontalschüttler oder im Wasserbad inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 erreicht wurde (exponentielle Wachstumsphase). Die OD<sub>600</sub> zum Zeitpunkt der Ernte wurde protokolliert und 1 ml der Kultur für 1 min bei 4°C und 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.



**Abb. 3.1.: Prinzip des  $\beta$ -Galaktosidase Assays.**

*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG) wird durch die  $\beta$ -Galaktosidase LacZ enzymatisch zu Galactose und dem gelben Farbstoff *o*-Nitrophenol (ONP) umgesetzt. Dieser kann über die Bestimmung der Absorption bei 420 nm quantifiziert werden.

Für den  $\beta$ -Galaktosidase-Assay wurde das Pellet auf Eis aufgetaut und in 1 ml Z-Arbeitspuffer aufgenommen. In 2 ml-Reaktionsgefäßen wurden geeignete Verdünnungen der Probe in einem Endvolumen von 1 ml auf Eis angelegt sowie eine Referenzprobe mit 1 ml Z-Puffer, die nachfolgend wie die Probenverdünnungen behandelt wurde. Um die Zellen permeabel zu machen, wurden jedem Ansatz 2 Tropfen Chloroform sowie 1 Tropfen 0,1% (w/v) SDS zugesetzt und die Proben gründlich gemischt. Es folgte eine Vorinkubation für 5 min bei 28°C, dann wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 200  $\mu$ l ONPG-Lösung gestartet und die Probe nochmals gut durchmischt, bevor sie für 30 min bei 28°C inkubiert wurde. Nach Ablauf der Zeit wurden dem Ansatz 500  $\mu$ l 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugesetzt und wiederum gründlich gemischt, um die Reaktion zu stoppen. Der Ansatz wurde für 12 min bei

Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert und 1 ml des Überstandes in eine Küvette überführt. Es wurde die Absorption der Probe bei 420 nm photometrisch bestimmt.

Eine Einheit  $\beta$ -Galaktosidase, die von einer  $OD_{600}$  Zellen pro Minute freigesetzt wird, berechnet sich durch:

$$1 \text{ Miller unit} = (\text{OD}_{420} \times V \times 1000) / (t \times \text{OD}_{600}),$$

wobei V der Verdünnungsfaktor und t die Reaktionszeit (in Minuten) ist.

0,1% SDS

1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Z-Puffer (pH 7,0):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	60 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	40 mM
KCl	10 mM
$\text{MgSO}_4$	1 mM

Z-Arbeitspuffer:

$\beta$ -Mercaptoethanol	20 mM
Chloramphenicol	10 mg
Z-Puffer (pH 7,0)	ad 100 ml

ONPG-Lösung:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	60 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	40 mM
ONPG	4 mg /ml

### 3.3.5. Transposonmutagenese (Madhusudan *et al.* 2005)

Die Zielstämme mit einer *lacZ*-Reporterfusion wurden mit dem Plasmid pKESK18 transformiert (siehe 3.3.3.). Aufgrund des temperatursensitiven Replikationsursprunges dieses Plasmids wurden die Ansätze nach dem Hitzeschock bei 30°C inkubiert, ebenso wie die ausplattierten Ansätze auf LB-Selektionsplatten (mit Kanamycin und Chloramphenicol).

100 ml LB-Medium (siehe 3.2.1.) mit Kanamycin und Chloramphenicol wurden mit einer Einzelkolonie der Transformante inokuliert und bei 30°C über Nacht oder bis zum

Erreichen der gewünschten  $OD_{600}$  inkubiert. Dann wurden Verdünnungen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  auf M9-Minimalmedium-Platten mit Glukose als Kohlenstoffquelle und supplementiert mit X-Gal (siehe 3.2.2.), sowie auf McConkey-Lac-Platten (siehe 3.2.4.) jeweils unter Selektion auf Chloramphenicol ausplattiert und über Nacht bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. In diesem Schritt wird einerseits die Replikation des Plamides unterbrochen, während gleichzeitig die Expression der Transposase aktiviert wird. Dadurch kommt es zu einer Integration des *mTn10*-Transposons in das Genom des Zielstammes.

Zusätzlich wurden Verdünnungen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-7}$  auf M9-Minimalplatten mit Glukose und X-Gal und auf McConkey-Lac-Platten unter Selektion auf Kanamycin-Resistenz für die Lebendzellzahlbestimmung plattiert und bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Zellzahlen auf allen Platten durch Zählung bestimmt. Kolonien mit dem gewünschten Phänotyp wurden auf M9-Minimalplatten mit Chloramphenicol und X-Gal vereinzelt, um diesen zu verifizieren. Anschließend wurde die Insertionsstelle des Transposons mittels ST-PCR (siehe 3.5.2.) bestimmt sowie die Aktivität der Reporterfusion im Vergleich zu den Ursprungstämmen im  $\beta$ -Galaktosidase-Assay (siehe 3.3.4) bestimmt.

### **3.4. Präparation und Nachweis von DNA**

#### 3.4.1. Präparation chromosomaler DNA

Für die Isolation chromosomaler DNA aus *E. coli* wurde das DNeasy Tissue Kit (Fa. Quiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben verwendet. Für die Elution wurden zunächst  $90\ \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  (vorgewärmt auf  $70^{\circ}\text{C}$ ) auf die Säule gegeben und diese für 5 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 8.000 rpm und Raumtemperatur. Anschließend wurden nochmals  $90\ \mu\text{l}$  auf  $70^{\circ}\text{C}$  vorgewärmtes  $\text{H}_2\text{O}$  auf die Säule gegeben und diese für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die beschriebene Zentrifugation wiederholt wurde.

#### 3.4.2. Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA wurde die Probe zunächst mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Volumen von  $100\ \mu\text{l}$  aufgefüllt. Dann wurden zunächst 1/10 Volumen Ammonium-Acetat (3 M, pH 5,2) zugegeben und gemischt, gefolgt von 2,5 Volumen Ethanol (100% reinst). Der Ansatz wurde nochmals gut gemischt und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Es folgte eine

Inkubation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 30 min, in denen die Probe wieder auftaute. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13.000 rpm zentrifugiert, bevor der Überstand vorsichtig entfernt wurde. Das Pellet wurde mit 500  $\mu\text{l}$  Ethanol (80% reinst) gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13.000 rpm. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet über Nacht getrocknet, bis das Ethanol vollständig verdampft war. Anschließend konnte die DNA im gewünschten Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert werden.

### 3.4.3. Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolation wurde mittels dem auf alkalischer Lyse und spezifischer Bindung von DNA an ein Silica-basierendes Anionentauscher-Material beruhenden Nucleospin Plasmid-Kit (Fa. Macherey-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Für die Isolation wurden 4 ml einer über Nacht inkubierten Kultur eingesetzt.

Midi-Präparationen von Plasmiden wurden mit Hilfe des NucleoBond PC100-Kit (Fa. Macherey-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Dieses Kit beruht ebenfalls auf der Freisetzung von DNA durch alkalische Lyse und deren spezifische Bindung an ein Silica-basierendes Anionentauscher-Material. Für die Präparation wurden 50 ml Kultur mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 3,5 eingesetzt. Die abschließende Elution erfolgte zur Erhöhung der Ausbeute mit 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  (bidest).

Maxi-Präparationen von Plasmiden wurden mittels Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System (Fa. Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.4.4. Reinigung von DNA und Gelelution

Die Produkte aus Enzymreaktionen mit DNA wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Funktionsweise des Kits beruht auf der spezifischen Bindung von DNA an eine Silica-Membran in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen.

Das QIAquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen, Hilden) erlaubt die Elution von DNA aus analytischen Agarosegelen (siehe 2.4.5.). Hierzu wurden die entsprechenden Banden bei UV-Licht der Wellenlänge 365 nm mit Hilfe einer UV Kontaktlampe Chroma 41 (Fa.



Laborgeräte Vetter, Wiesloch) sichtbar gemacht, ausgeschnitten und gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

### 3.4.5. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA-Moleküle können in einem elektrischen Feld durch Gelelektrophorese gemäß ihrer Größe aufgetrennt werden, da DNA über ein negativ geladenes Grundgerüst verfügt.

Hierzu wurden Gele aus 60°C warmer Agarose-Lösung mit Ethidiumbromid in einer horizontalen Elektrophorese-Kammer des Typs PerfectBlue Gelsystem Mini M (Fa. PeqLab, Erlangen) gegossen. Die Polymerisation der Agarose erfolgte durch Abkühlen auf Raumtemperatur. Anschließend wurden die Gele mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Sofern nicht anders angegeben wurden 1,5% Agarose-Gele verwendet.

DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde des Weiteren ein Marker mit DNA-Fragmenten bekannter Größe aufgetragen, soweit nicht anders vermerkt GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte bei 100-170 Volt bis die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers im unteren Viertel des Gels angelangte. Anschließend wurden die Gele direkt unter UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm mittels einer Gel Doc 2.000-Anlage (Fa. Bio-Rad, München) betrachtet und dokumentiert.

EDTA-Stammlösung (pH 8,0)	500 mM EDTA
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml

50x TAE (pH 8,3):

Tris	800 mM
Essigsäure (100 %)	950 mM
EDTA (pH 8,0)	50 mM

Agarosegel:

Agarose	1,5 % w/v	1,5 g
Ethidiumbromid (1:20.000)		5 µl
1x TAE-Puffer		ad 100 ml

6x Ladepuffer:

Glycerin	5 ml
50x TAE-Puffer	200 µl
Bromphenolblau	0,01 g
Xylencyanol	0,01 g
H <sub>2</sub> O (bidest)	4,5 ml

### **3.5. Allgemeine Klonierungstechniken und Enzymreaktionen mit DNA**

#### 3.5.1. Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR (Mullis *et al.* 1986))

Bei der Polymerasekettenreaktion wird ein durch zwei als Primer eingesetzte Oligonukleotide definiertes Stück DNA enzymatisch *in vitro* vervielfältigt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7.3.. zusammengefasst. Alle Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme wurden gemäß den Herstellerangaben und mittels der mitgelieferten Puffer und Lösungen erstellt. Alle Reaktionen fanden in Geräten des Typs Tpersonal combi (Fa. Biometra, Göttingen) oder Mastercycler gradient (Fa. Eppendorf, Hamburg) statt.

Es wurden für verschiedene Aufgaben unterschiedliche Polymerasen verwendet:

*Taq* (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot und aus eigener Produktion) als Polymerasen ohne Korrekturlese-Aktivität, *Pfu* (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) als Polymerase mit Korrekturlese-Aktivität und sowie TripleMaster-Polymerase (Fa. Roche, Mannheim). Als Matrize für die Amplifikation wurde entweder chromosomale DNA oder Plasmide verwendet.

#### 3.5.2. Semi-random two-step PCR (ST-PCR; (Madhusudan *et al.* 2005))

Die ST-PCR stellt eine Methode zur Bestimmung von Transposon-Insertionsstellen (in diesem Fall *mTn10*, vergleiche 3.3.5.) dar. Hierzu wurden zwei aufeinander folgende PCR-Schritte durchgeführt. Im ersten Schritt wurde ein Oligopaar als Primer eingesetzt, von denen eines mit der stromaufwärts gerichteten Flanke des Transposons hybridisiert (BG84), während das andere (BG 80) eine definierte Sequenz aus 20 Nukleotiden am 5'-Ende besitzt, gefolgt von einer degenerierten Sequenz aus 10 Nukleotiden und einer GATC-Sequenz am 3'-Ende (vgl. Abb. 3.2.). Dieses Oligonukleotid hybridisiert

statistisch alle 300 bis 400 Basenpaare einmal im Genom, so dass ein DNA-Fragment amplifiziert werden kann, das den das Transposon flankierenden Bereich umfasst.

Für die erste PCR wurde folgendes Cyclerprogramm verwendet:

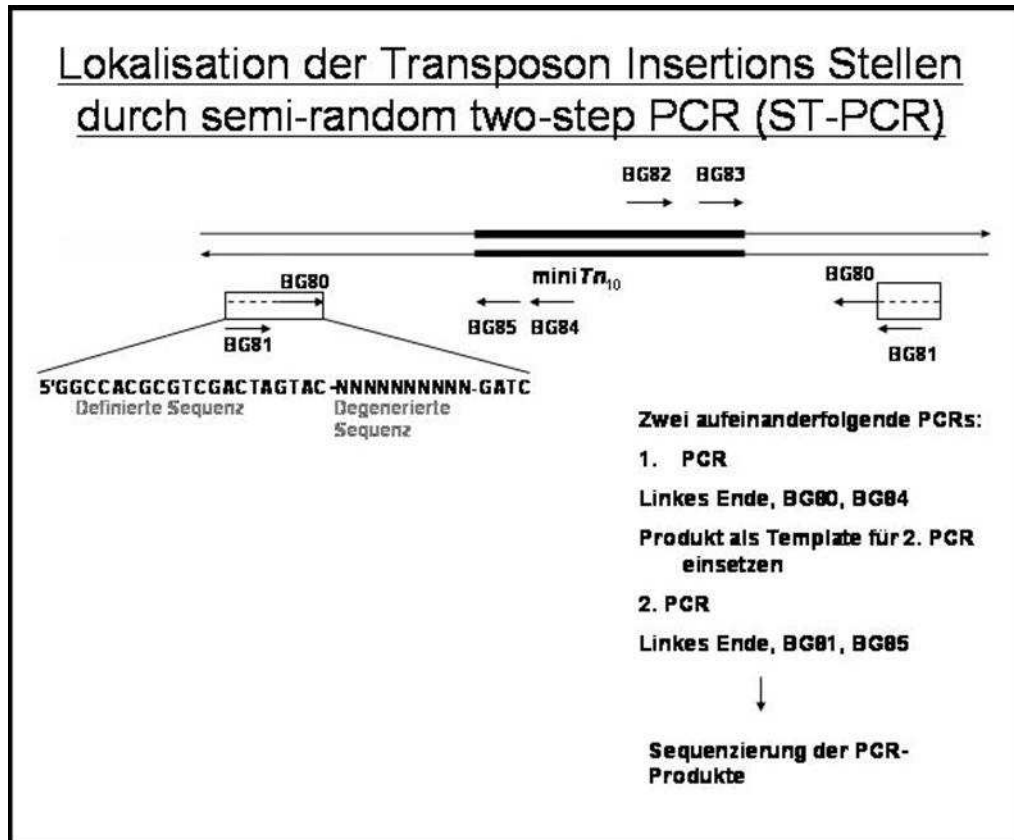
94°C	2 min	
94°C	30 sec	
42°C	30 sec	-1°C pro Zyklus
72°C	3 min	5 Wiederholungen
94°C	30 sec	
65°C	30 sec	
72°C	3 min	24 Wiederholungen
4°C	Pause	

Das Produkt dieser ersten PCR wurde mit einem vierfachen Volumen H<sub>2</sub>O verdünnt und als Matrize in einer zweiten PCR-Reaktion eingesetzt. Hierbei wurden Oligonukleotide als Primer eingesetzt, von denen einer (BG81) mit dem definierten Bereich des Oligonukleotide BG80 hybridisiert, während der andere komplementär zu einem Abschnitt des Transposons ist, der durch das Oligonukleotidpaar der ersten Reaktion umfasst wird (BG85). Das Produkt dieser zweiten Reaktion wurde mittels Gelelektion (siehe 3.4.4.) aufgereinigt und anschließend sequenziert (siehe 3.5.7.).

Für die zweite PCR wurde folgendes Cyclerprogramm verwendet:

94°C	2 min	
65°C	30 sec	
72°C	3 min	29 Wiederholungen
4°C	Pause	

Um die Bereiche zu amplifizieren, die das Transposon stromabwärts flankieren, wurde eine analoge Methode unter Verwendung der Oligopaare BG82 und BG80 (für die erste PCR) respektive BG 81 und BG83 (zweite PCR) angewandt.



**Abb. 3.2.: Schematische Darstellung der Semi-random two-step PCR (ST-PCR).**

Das Oligonukleotid BG80 hybridisiert statistisch alle 300-400 bp im Genom und ermöglicht so gepaart mit BG84 die Amplifikation des Bereiches stromaufwärts des Transposons („linkes Ende“). Das Produkt dieser ersten PCR (siehe 3.6.1.) wurde als Matrize für eine weitere PCR eingesetzt. Bei dieser zweiten Reaktion hybridisiert der Primer BG81 an der durch BG80 definierten Sequenz, während das Oligonukleotid BG85 im *mTn10* hybridisiert, jedoch innerhalb des durch das Paar BG80/BG84 umfassten Bereich.

Die Produkte der zweiten PCR wurden in einem analytischen Agarose-Gel kontrolliert. War eine dominante Bande vorhanden, so wurde das Produkt der zweiten PCR nochmals auf ein präperatives Agarosegel aufgetragen und die Bande aus dem Gel eluiert (siehe 3.5.4.) und anschließend sequenziert (siehe 3.5.7.).

Die Identifizierung der stromabwärts des Transposons gelegenen Sequenzen („rechtes Ende“) verlief analog unter Verwendung der Primer BG82 + BG80 für die erste PCR, und BG 81 und BG 83 für die zweite PCR.

### 3.5.3. Generierung von Gen-Deletionen (Datsenko und Wanner 2000)

Bei dieser Methode zur Generierung von chromosomalen Gen-Disruptionen und -Deletionen werden PCR-Produkte genutzt, bei denen eine Resistenzkassette von Sequenzen flankiert wird, die homolog zu den flankierenden Sequenzen des Zielgens sind und somit eine Rekombination ermöglichen. Desweiteren tragen diese Inserts

sogenannte FRT-Sequenzen (FLP recognition targets), die es erlauben, die integrierte Resistenzkassette wieder aus dem Genom zu entfernen, wodurch lediglich eine „Narbe“ entsteht, die sowohl Stop-Codons in allen sechs Leserastern trägt, als auch eine optimale Ribosomenbindestelle zur Expression stromabwärts gelegener Gene generiert. Hierdurch können markerlose Gen-Deletionen generiert werden, die das Risiko polarer Effekte auf die Expression benachbarter Gene minimieren. Für die homologe Rekombination wird ein temperatursensitives Helferplasmid (pKD46, siehe Tabelle 7.2.) genutzt, welches die Rekombinase Red ( $\gamma$   $\beta$  *exo*) des Phagen  $\lambda$  unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors trägt. Zum Entfernen der Resistenzkassette wird das Helferplasmid pCP20 (siehe Tabelle 7.2.) verwendet, welches eine temperaturabhängige Expression von FLP ermöglicht.

### 3.5.3.1 Vorbereitung der Stämme

Der Zielstamm wurde zunächst chemisch kompetent gemacht (siehe 3.3.2) und wie unter 3.3.3. beschrieben mit dem temperatursensitiven Helferplasmid pKD46 transformiert. Die Transformanten wurden auf LB+Ampicillin-Platten (siehe 3.2.1.) bei 30°C selektiert.

### 3.5.3.2. Amplifikation der Resistenzkassette mit homologen Bereichen zu den flankierenden Sequenzen des Zielgens

Oligonukleotide, die als Primer zur Generierung des DNA-Fragmentes für die Elektroporation verwendet wurden, bestehen aus 40 bis 45 Basen die einerseits homolog zu den Bereichen direkt stromaufwärts beziehungsweise -abwärts des Zielgens sind andererseits zu Bereichen der flankierenden Regionen der Chloramphenicol-Resistenzkassette auf dem Plasmid pKD3 (im Fall des Vorwärts-Primers: GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG; für den Rückwärts-Primer: CATATGAAT ATCCTCCTTAGTTCCTATTCC). Die PCR wurde wie unter 3.5.1. beschrieben durchgeführt und das resultierende Fragment mittels Gel-Elution aufgereinigt (siehe 3.4.4.). Die Konzentration sollte mindestens 100 ng/μl betragen, gegebenenfalls muss das PCR-Produkt mittels Ethanol-Fällung (siehe 3.4.2.) aufkonzentriert werden.

3.5.3.3. Herstellung elektrokompeter Zellen (Yu und Court 1998)

Der mit pKD46 transformierte Zielstamm wurde in 5 ml SOB (siehe 3.2.3.) mit Ampicillin und 20 mM L-Arabinose (zur Induktion des  $\gamma$ -RED Systems) bei 30°C auf dem Horizontalschüttler über Nacht inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 50 ml desselben Mediums zu einer OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert und auf dem Horizontalschüttler bei 30°C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde. Die Kultur wird in ein auf 4°C vorgekühltes 50 ml Plastikröhrchen überführt und 1 Stunde auf Eis inkubiert.

Es folgen eine Reihe von Wasch- und Zentrifugationsschritten:

- Zentrifugation für 15 min bei 4° C und 3.000 rpm
- Überstand verwerfen, Pellet in 50 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendieren
- Zentrifugation für 15 min bei 4° C und 3.000 rpm
- Überstand verwerfen, Pellet in 25 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendieren
- Zentrifugation für 15 min bei 4° C und 3.000 rpm
- Überstand verwerfen, Pellet in 2 ml eiskaltem Glycerol 10% (v/v) resuspendieren
- Zentrifugation für 15 min bei 4° C und 3.000 rpm

Anschließend wird das Pellet in 200 µl eiskaltem Glycerol 10% (v/v) aufgenommen und für die Elektroporation eingesetzt

3.5.3.4. Elektroporation (Yu und Court 1998)

2 mm-Elektroporationsküvetten (Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf) wurden auf Eis vorgekühlt. 100 ng DNA-Fragment (in einem maximalen Volumen von 10 µl) wurden mit 40 µl elektrokompeteren Zellen in einem vorgekühlten 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette überführt und es erfolgte ein Elektroschock für 3 sec bei 1,8 kV, 25 µF und 200 Ω. Sofort nach dem Schock wurde 1 ml SOC-Medium (siehe 3.2.3.) zugegeben und der Ansatz in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation für 60 min auf dem Horizontalschüttler bei 37° C wurden den 500 µl des Ansatzes auf LB-Selektionsplatten (siehe 3.2.1) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Der restliche Ansatz wurde für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert, auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Transformanten wurden mittels PCR unter Verwendung umfassender und Resistenzkassetten-spezifischer Oligonukleotide als Primer auf Integration der

Resistenzkassette und durch Plattieren auf LB-Selektionsplatten mit Ampicillin auf Verlust des temperatursensitiven Plasmids pKD46 überprüft.

### 3.5.3.5. Entfernen der Kassette

Um eine markerfreie Deletion des Zielgens zu erhalten, muss die eingebrachte Resistenzkassette wieder aus dem Genom entfernt werden. Hierzu wurde ein Rekombinase-System genutzt, das die die Resistenzkassette flankierenden FRT-Sequenzen erkennt und den dazwischen liegenden DNA-Bereich entfernt. Hierzu wurde der Zielstamm zunächst chemisch kompetent gemacht (siehe 3.3.2) und dann mittels Hitzeschock mit dem Plasmid pCP20 transformiert (siehe 3.3.3.). Die Inkubation nach dem Hitzeschock sowie die Inkubation der LB-Selektionsplatten (siehe 3.2.1.) über Nacht erfolgte bei 30°C, da das Plasmid pCP20 über einen temperatursensitiven Replikationsursprung verfügt.

Transformanten wurden vereinzelt und bei 37°C in 5 ml LB-Medium über Nacht auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Anschließend wurden sie auf LB-Platten sowie LB-Selektionsplatten mit Chloramphenicol oder Ampicillin plattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert, um den Verlust der Resistenzkassette sowie des Helferplasmides zu prüfen. Der Deletionsstamm ohne Resistenz wurden nachfolgend mittels PCR (siehe 3.5.1.) überprüft.

### 3.5.4. Restriktion von DNA

DNA-Fragmente und Plasmide wurden mit Hilfe von unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) geschnitten. Die verwendeten Enzyme sind an den entsprechenden Stellen vermerkt. Alle Reaktionsansätze wurden gemäß den Herstellerangaben erstellt. Pro Restriktionsreaktion wurden 500-700 ng DNA eingesetzt.

Um die benötigte Menge an Enzym zu berechnen, wurde folgende Formel verwendet :

$$\frac{MW(\lambda)}{MW(x)} * \frac{n(x)}{n(\lambda)} = \frac{u(\text{Enzym})}{\mu\text{g}(x)}$$

mit  $\lambda$  Referenz-DNA (Phage  $\lambda$ )  
 $x$  zu verdauende DNA

MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der Schnittstellen

Als Referenz diente die DNA des Phagen  $\lambda$ . Für die Reaktionen wurde das 1,5fache der errechneten Enzymmenge eingesetzt.

Restriktionsansätze wurden für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie mittels QIAquick PCR Purification Kit wie unter 3.4.4. beschrieben aufgereinigt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.4.5.) überprüft. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mittels eines Nanodrop ND-1000 Spectrophotometers (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

### 3.5.5. Dephosphorylierung

Mittels Restriktionsenzymen geschnittene Vektoren wurden dephosphoryliert, um die Wahrscheinlichkeit einer Religation in der anschließenden Ligationsreaktion zu minimieren. *Shrimp Alkaline Phosphatase* bzw. *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) entfernt die 5'-Phosphatgruppe der DNA hydrolytisch, so dass das Plasmid nur dann wieder eine zirkuläre Form annehmen kann, wenn ein phosphoryliertes DNA-Fragment während der Ligation integriert wird. Für die Dephosphorylierung wurde den Vektor-Restriktionsansätzen nach der Inkubation 1,5  $\mu$ l der alkalischen Phosphatase zugegeben und diese für weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze wie unter 3.4.4. beschrieben gereinigt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.4.5.) überprüft. Auch hier erfolgte die Bestimmung der Konzentration mittels eines Nanodrop ND-1000 Spectrophotometers (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

### 3.5.6. Ligation

Die T4-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Molekülen.

Diese Reaktion wurde mit Hilfe von T4 DNA Ligase (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) gemäß Herstellerangaben und unter Verwendung der mitgelieferten Lösungen durchgeführt. Es wurden pro Ligationsreaktion 50-100 ng Vektor-DNA und der 1,5-3fache molare Überschuss an Fragment verwendet. Der Ansatz wurde für 3 h bei



Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert und direkt zur Transformation (siehe 3.2.3) eingesetzt.

### 3.5.7. Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977)

Plasmide und andere manipulierte DNA-Sequenzen wurden durch Sequenzierung relevanter DNA-Abschnitte überprüft. Alle Sequenzierungsreaktionen wurden vom GenoMIK-Network (Göttingen) durchgeführt. Hierzu wurden 200 ng DNA und 5 pMol Oligonukleotid als Primer in 5 µl H<sub>2</sub>O (bideist) Endvolumen verwendet. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mittels der Programme CHROMAS und Vector NTI analysiert (siehe 3.9.).

## **3.6. Präparation, Synthese und Nachweis von RNA**

### 3.6.1. Präparation von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde mittels des Rneasy Mini Kit (Fa. Quiagen, Hilden) präpariert. Hierzu wurde eine Kulturmenge äquivalent zu einer OD<sub>600</sub> von 1 verwendet und nach Herstellerangabe behandelt. Nach der Präparation wurde die RNA wie unter 3.6.2. beschrieben gefällt.

Alternativ wurde RNA für Northern Blot Analysen mit radioaktiv-markierten Sonden (siehe 3.6.10.) mittels Trizol präpariert. Hierzu wurde ein Äquivalent von OD<sub>600</sub> = 4 der Kultur von Interesse abgenommen, mit 1/5 Volumen Stop-Lösung gemischt und in Flüssigstickstoff gefroren. Anschließend wurden die Proben auf Eis aufgetaut und durch Zentrifugation für 10 min bei 8.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 8.000 rpm und 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und das Pellet in 1 ml Trizol (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) gelöst. Anschließend wurden 400 µl Chloroform zugegeben und der Ansatz durch Invertieren gründlich gemischt. Er wurde dann in ein PLG-Röhrchen (Phase Lock Gel, Fa. 5 PRIME, Hamburg) überführt und nach einer Inkubation für 2 bis 5 min bei Raumtemperatur für 15 min bei 13.000 rpm und 15°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde danach in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 450 µl Isopropanol versetzt. Nach gründlichem Mischen durch Invertieren folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Der

Ansatz wurde für 30 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 350 µl EtOH 70% (reinst.) gewaschen und nochmals für 15 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Die RNA wurde in 30 µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei) aufgenommen und die Konzentration mittels eines Nanodrop ND-1000 Spectrophotometers (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt und die Qualität der Präparation wie unter 2.6.4. beschrieben überprüft.

Stop-Lösung:

Phenol	5% (v/v)
Ethanol	95% (v/v)

### 3.6.2. Fällung von RNA

Zur Fällung von RNA wurde das Volumen der Probe zunächst mit H<sub>2</sub>O (RNase-frei) auf 100 µl eingestellt. Es folgte die Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 12,5 µl 4 M LiCl. Der Ansatz wurde anschließend mit eiskaltem 375 µl Ethanol (100% reinst) gemischt und über Nacht bei -20° C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 13.000 rpm. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70% reinst) gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 13.000 rpm, bevor der Überstand vorsichtig und möglichst vollständig abgenommen wurde. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4°C und 13000 rpm wurde der Rest des Überstandes abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend konnte die RNA im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O (RNase-frei) aufgenommen werden.

### 3.6.3. *In vitro* Transkription T7

Zur *in vitro* Transkription von RNA wurden Komponenten des DIG-RNA labeling Kits (Fa. Roche, Mannheim) oder alternativ das MEGAScript T7 Kit (Fa. Amersham, Freiburg) verwendet, welche beide auf der *in vitro* Transkription definierter Bereiche von DNA-Matrizen aus basiert. Hierzu wurde zunächst mittels PCR (siehe 3.5.1.) Matrizen-DNA mit einer T7-Promotorsequenz generiert und mittels Gel-Elution (siehe 3.4.5.) aufgereinigt. In der *in vitro* Transkription wurden 500-1000 ng DNA eingesetzt.

Die Vorbereitung der Ansätze erfolgte gemäß der Herstellerangaben in einem Endvolumen von 100 µl. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C erfolgte eine Behandlung der Transkriptionsansätze mit dem „DNA-free Kit“ (Fa. Ambion, Austin) zur Entfernung der Matrizen-DNA gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurde die RNA wie unter 3.6.2. beschrieben gefällt, das Pellet in 50 µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei) aufgenommen und mittels eines Nanodrop ND-1000 Spectrophotometers (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) quantifiziert. Zusätzlich wurde die RNA wie unter 3.6.4 beschrieben durch Gelelektrophorese überprüft.

### 3.6.4. Nachweis von RNA

RNA-Moleküle können, wie auch DNA, in einem elektrischen Feld durch Gelelektrophorese gemäß ihrer Größe aufgetrennt werden, da RNA ebenfalls über ein negativ geladenes Grundgerüst verfügt.

Zum Nachweis von RNA wurden 1% Agarose-Gele mit Formaldehyd verwendet. Hierzu wurde zunächst 1 g Agarose in 72 ml H<sub>2</sub>O durch Erhitzen gelöst und anschließend im Wasserbad auf 65° C temperiert. Anschließend wurden unter einem Abzug 10 ml 10x MOPS und 18 ml Formaldehyd (37%) zugesetzt, bevor das Gel in einer horizontalen Elektrophorese-Kammer des Typs PerfectBlue Gelsystem Mini M (Fa. PeqLab, Erlangen) gegossen wurde. Die Polymerisation der Agarose erfolgte durch Abkühlen auf Raumtemperatur. Anschließend wurden die Gele mit 1x MOPS überschichtet.

RNA-Proben wurden mit H<sub>2</sub>O (RNase-frei) auf ein Volumen von 10 µl gebracht, mit 5 µl RNA-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 65°C denaturiert. Nach einem raschen Abkühlen auf Eis wurden sie in die Taschen des Gels aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde des Weiteren ein Marker mit RNA-Fragmenten bekannter Größe aufgetragen, die RiboRuler low range RNA Ladder (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt bis die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers im unteren Viertel des Gels angelangt war. Anschließend wurden die Gele direkt unter UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm mittels einer Gel Doc 2.000-Anlage (Fa. Bio-Rad, München) dokumentiert und gegebenenfalls für Northern Blot-Analysen (siehe 3.6.6) eingesetzt.

10x MOPS

MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM
H <sub>2</sub> O (dest)	ad 1.000 ml
pH 7,0 einstellen mit NaOH	

MOPS muss auf eine besondere Weise autoklaviert werden: Es darf maximal 10 min lang in einem Dampfkochtopf sterilisiert werden. Nach dem Autoklavieren sollte die Lösung leicht gelb sein.

### 3.6.5. Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden für Northern Blot Analysen

Um RNA-Sonden für Northern Blot Analysen zu generieren, wurde in einer *in vitro*-Transkription eine DIG-markierte RNA hergestellt, die der revers-komplementären Sequenz der Ziel-RNA entsprach. Hierzu wurde wie unter 3.6.3. das DIG-RNA labeling Kits (Fa. Roche, Mannheim) verwendet, jedoch statt des rNTP-Mixes der DIG RNA-labelling Mix 10x desselben Herstellers verwendet. Die RNA wurde gefällt (siehe 3.6.2.) und in einem Volumen von 100 µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei) mit 1 µl RNase-Inhibitor für 2 h bei 37°C gelöst.

Um die Qualität der DIG-Markierung zu überprüfen wurden Verdünnungen der Sonde von 10<sup>0</sup> bis 10<sup>-4</sup> angelegt und je 1 µl dieser Verdünnungen auf eine Nylonmembran aufgetropft. Die Membran wurde luftgetrocknet und die RNA anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm für 3 min fixiert. Anschließend wurde die Membran für 5 min in Puffer I inkubiert. Dieser und alle nachfolgenden Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler. Es folgte eine Inkubation für 30 min in Puffer II, gefolgt von einer Inkubation für 30 min in Puffer II gemischt 10.000:1 mit Anti-Digoxigenin-AP fragments (Fa. Roche, Mannheim). Anschließend wurde die Membran drei Mal für je 10 min in Puffer I gewaschen und abschließend für 10 min in Puffer III inkubiert. Die Membran wurde in 1 ml Puffer III mit 5 µl CDP-Star (Fa. Roche, Mannheim) gewendet, in eine Klarsichtfolie überführt und 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Signalstärke wurde anschließend über einen Zeitraum von 5 min in einem Chemi-Smart 5.000 Chemilumineszenz-System (Fa. PeqLab, Erlangen) unter Verwendung der zugehörigen ChemiCapt 11.07-Software dokumentiert.

10% Blocking Reagenz:

Blocking Reagenz	10 g
1x Puffer I	ad 100 ml

5x Puffer I:

Maleinsäure	500 mM
NaCl	750 mM
Tween20	0.3 %
NaOH	900 mM
pH 7,5 einstellen mit NaOH	

Puffer II:

5x Puffer I	40 ml
10% Bocking Reagenz	20 ml
H <sub>2</sub> O (dest)	ad 200 ml

Puffer III (pH 9,5):

Diethanolamin	9.63 ml
H <sub>2</sub> O (dest)	ad 200 ml

3.6.6. Herstellung <sup>32</sup>P -markierter Sonden für Northern Blot Analysen

Für diese Art der Northern Blot-Analyse wurden als Sonde Oligonukleotide verwendet, die komplementär zur Sequenz der zu detektierenden RNA sind. Diese Oligonukleotide wurden durch T4-Polynukleotid Kinase (PNK, Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) mit <sup>32</sup>P markiert.

Die Reaktionsansätze für die Markierung waren wie folgt zusammengesetzt:

Oligonukleotid (10 nM)	1 µl
10x PNK-Puffer	2 µl
<sup>32</sup> P-γ-ATP	5 µl
PNK	1 µl
H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	11 µl

Diese Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden verbliebene freie Nukleotide unter Verwendung von G-25-Säulen (Fa. GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben entfernt.

Die so generierten <sup>32</sup>P-markierten Oligonukleotide wurden wie unter 3.6.10 beschrieben als Sonde in Northern Blot Analysen eingesetzt.

### 3.6.7. Northern Blot Analyse (für Detektion mit DIG-markierten Sonden)

Für den Vakuum-Transfer mittels des VacuGene XL-Systems (Fa. Amersham, Freiburg) wurden positiv geladene Nylonmembranen (Fa. Roche, Mannheim) in Größe des Gels ausgeschnitten und in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran auf mit H<sub>2</sub>O (dest) befeuchtete Trägerplatte aufgelegt und mit einer Plastikmaske abgedichtet. Das Agarosegel wurde auf die Membran und die Plastikmaske aufgelegt, wodurch die Apparatur luftdicht verschlossen wurde. Der Transfer erfolgte bei einem Vakuum von 60 mBar. Das Gel wurde während des Transfers mit den folgenden Lösungen überschichtet:

Denaturierungslösung	5 min
Neutralisierungslösung	5 min
20x SSC	4-5 h

Beim Wechsel der Lösungen wurden Reste der vorherigen Lösung durch abgießen entfernt. Nach Beendigung des Transfers wurde die RNA mittels Bestrahlung mit UV-Licht (3 min, 254 nm) an der Membran fixiert. Anschließend wurden die Membranen luftgetrocknet und unter UV-Licht die Banden des RNA-Standards auf der Membran markiert. Die Membran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und für 2 h bei 68°C in einem OV2-Hybridisierungssofen (Fa. Biometra, Göttingen) in 15 ml Prä-Hybridisierungslösung unter Rotation inkubiert. Die Hybridisierung mit der Sonde und die Detektion der Signale erfolgten wie unter 3.6.9. beschrieben.

Denaturierungslösung:

NaOH	50 mM
NaCl	10 mM

Neutralisierungslösung:

Tris	100 mM
pH 7,4 einstellen mit HCl	

10% Blocking Reagenz:

Blocking Reagenz	10 g
1x Puffer I	ad 100 ml

Prä-Hybridisierungslösung:

Formamid	25 ml
20x SSC	12,5 ml
Blocking Reagenz 10%	10 ml
N-Lauroylsarcosin 10%	500 µl
SDS 10%	100 µl

5x Puffer I:

Maleinsäure	500 mM
NaCl	750 mM
Tween20	0.3 %
NaOH	900 mM
pH 7,5 einstellen mit NaOH	

20x SSC

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0.3 M
pH 7,0 einstellen mit HCl	

3.6.8. Slot Blot Analyse (für Detektion mit DIG-markierten Sonden)

In einer Slot Blot Analyse wird RNA nicht durch Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt, sondern direkt auf eine Nylonmembran transferiert. Dadurch sind Slot Blot Analysen zwar in der Lage, eine Aussage über die Gesamtmenge einer bestimmten RNA zu liefern, jedoch nicht über Größe oder unterschiedliche Spezies selbiger.

Die Proben wurden auf zunächst eine RNA-Menge von 2 µg, 1 µg, 0,5 µg und 0,25 µg in 100 µl eingestellt. Die positiv geladene Nylonmembran (Fa. Roche, Mannheim)

wurde in 10x SSC gewässert und anschließend in eine PR648 Slot Blot-Apparatur (Fa. Hoefer, San Francisco) eingelegt. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgte durch Anlegen eines Unterdruckes mittels einer VacuGene XL-Pumpe (Fa. Amersham, Freiburg). Nach dem vollständigen Transfer wurde die Membran der Apparatur entnommen und luftgetrocknet, bevor die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm für 3 min fixiert wurde.

Die Membran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und für 2 h bei 68° C in einem OV2-Hybridisierungs-ofen (Fa. Biometra, Göttingen) in 15 ml Prä-Hybridisierungslösung unter Rotation inkubiert. Die Hybridisierung mit der Sonde und die Detektion der Signale erfolgten wie unter 3.6.9. beschrieben.

Prä-Hybridisierungslösung:

Formamid	25 ml
20x SSC	12,5 ml
Blocking Reagenz 10%	10 ml
N-Lauroylsarcosin 10%	500 µl
SDS 10%	100 µl

10% Blocking Reagenz:

Blocking Reagenz	10 g
1x Puffer I	ad 100 ml

20x SSC

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0.3 M
pH 7,0 einstellen mit HCl	

5x Puffer I:

Maleinsäure	500 mM
NaCl	750 mM
Tween20	0.3 %
NaOH	900 mM
pH 7,5 einstellen mit NaOH	



3.6.9. Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden und Detektion

Für die Sondenlösung wurden 5 ml Prä-Hybridisierungslösung mit 15 µl der DIG-markierten Sonde versetzt und für 15 min in kochendem Wasser denaturiert und anschließend rasch auf Eis abgekühlt.

Nach der Inkubation der Membran in Prä-Hybridisierungslösung (siehe 3.6.6. beziehungsweise 3.6.7.) wurde diese gegen die Sondenlösung ausgetauscht und die Membran über Nacht bei 68°C im OV2-Hybridisierungssofen (Fa. Biometra, Göttingen) unter Rotation inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurde die Sondenlösung in ein steriles 15 ml-Plastikröhrchen gegossen und bis zu fünf Mal wiederverwendet (Lagerung bei -20°C).

Die Membran wurde zunächst zwei Mal für 5 min bei Raumtemperatur in 5 ml Waschlösung I inkubiert und dabei per Hand gerollt. Anschließend erfolgten drei Waschschrte für 20 min mit je 5 ml Waschlösung II im Hybridisierungssofen bei 68°C und Rotation, bevor die Membran in eine saubere Plastikschaie überführt wurde. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Horizontal-schüttler. Zunächst wurde die Membran für 5 min in 20 ml Puffer I inkubiert, danach für 30 min in 20 ml Puffer II. Es folgte die Bindung des sekundären Antikörpers Anti-Digoxigenin-AP fragments (Fa. Roche, Mannheim), welcher 1:10.000 in Puffer II verdünnt wurde (2,5 µl auf 25 ml), bevor die Membran für weitere 30 min darin geschwenkt wurde. Nach der Bindung des Antikörpers folgten drei Waschschrte für jeweils 10 min mit 20 ml Puffer I, bevor die Membran für 10 min in 10 ml Puffer III geschwenkt wurde.

Anschließend wurde die Membran in eine frische Schale überführt und in 1 ml Puffer III mit 5 µl des Chemilumineszenz-Substrates CDP-Star (Fa. Roche, Mannheim) für 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Membran wurde dann in eine frische durchsichtige Plastikfolie gelegt und die Lumineszenz über einen Zeitraum von 20 min und 45 min in einem Chemi-Smart 5.000 Chemilumineszenz-System (Fa. PeqLab, Erlangen) unter Verwendung der zugehörigen ChemiCapt 11.07-Software dokumentiert.

10% Blocking Reagenz:

Blocking Reagenz	10 g
1x Puffer I	ad 100 ml

5x Puffer I:

Maleinsäure	500 mM
NaCl	750 mM
Tween20	0.3 %
NaOH	900 mM
pH 7,5 einstellen mit NaOH	

Puffer II:

5x Puffer I	40 ml
10% Bocking Reagenz	20 ml
H <sub>2</sub> O (dest)	ad 200 ml

Puffer III (pH 9,5):

Diethanolamin	9.63 ml
H <sub>2</sub> O (dest)	ad 200 ml

Waschpuffer I:

2x SSC
0.1% SDS

Waschpuffer II:

0.1x SSC
1% SDS

3.6.10. Northern Blot Analyse (für Detektion mit <sup>32</sup>P -markierten Sonden)

5 µg RNA in einem Volumen von 5 µl wurden wie unter 3.6.4. beschrieben in einem 6% Polyacrylamid-Gel (7M Harnstoff, TBE) bei 300 Volt in einer SE 600 Vertical Unit (Fa. Hoefer, San Francisco, USA) für 2 h aufgetrennt. Als Marker wurde in diesem Fall <sup>32</sup>P-markierte pUC8-DNA verwendet.

Nach dem Gellauf wurde die RNA in einer Trans-Blot Plus cell (Fa. Bio-Rad, München) auf eine Hypobond XL-Membran (Fa. Amersham, Freiburg) für 1 h bei 50 Volt übertragen und die RNA anschließend durch Bestrahlung mit 120 Joule UV-Licht fixiert.

### 3.6.11. Hybridisierung mit <sup>32</sup>P -markierten Sonden und Detektion

Membranen für die Detektion mit <sup>32</sup>P-markierten Sonden (siehe 3.6.9.) wurden einer Prähybridisierung für 1 h in 15 ml Rapid-hyb-Puffer (Fa. GE Healthcare, Freiburg) bei 42°C in einem Hybridisierungssofen unterzogen. Anschließend wurden 5 µl einer <sup>32</sup>P-markierten Sonde (siehe 3.6.6.) zugegeben und für 2 h bei 42°C hybridisiert.

Die Membran wurde getrocknet und danach für 15 min in 5x SSC + 0,1% SDS gewaschen, anschließend für ebenfalls je 15 min in 1x SSC + 0,1% SDS beziehungsweise 0,5x SSC + 0,1% SDS. Nach dem Trocknen der Membran wurde diese für 2 h auf einen Molecular dynamics GP Storage Phosphor-Schirm (Fa. GE Healthcare, Freiburg) aufgelegt und die Strahlung der radioaktiv-markierten Sonden und des Markers mittels eines FujiImager BAS (Fa. Fuji, Düsseldorf) beziehungsweise eines Molecular dynamics STORM-BSO (Fa. GE Healthcare, Freiburg) ausgewertet.

20x SSC	NaCl	3 M
	Natriumcitrat	0.3 M
	pH 7,0 einstellen mit HCl	

### 3.6.12. Präparation und Markierung von RNA für MicroArray-Analysen

Die gewünschten Stämme wurden in 5 ml LB-Medium (siehe 3.2.1.) bei 37°C unter Agitation inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurden 20 ml LB-Medium der Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert und bei 37°C unter Agitation inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 2 erreicht wurde. Ein Äquivalent von 4 OD<sub>600</sub>-Einheiten wurde abgenommen und mit 400 µl Stop-Lösung gemischt. Anschließend wurden die Pellets bis zur weiteren Verwendung in Flüssigstickstoff gelagert.

Die Pellets wurden auf Eis aufgetaut und durch Zentrifugation für 2 min bei 4.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei) mit 50 mg/ml Lysozym aufgenommen und 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, und mittels PureYield RNA Midi-Prep Kit (Fa. Promega, Mannheim) weiter behandelt. Zunächst wurden 75 µl Lysis agent zugegeben und durch invertieren gemischt. Es folgte eine Inkubation für 3 min bei 70°C, bevor die Probe für 10 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert wurde.

Der Überstand wurde möglichst vollständig in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl EtOH 100% (reinst) gemischt. Der Ansatz wurde in eine Spin Column gefüllt und für 1 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und 600 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben, bevor der beschriebene Zentrifugationsschritt wiederholt wurde. Der Durchlauf wurde wiederum verworfen, dann wurden 50 µl Dnase-Mix (5 µl MnCl<sub>2</sub> (90 mM), 40 µl Yellow Dnase core buffer (Fa. Promega, Mannheim), 5 µl DnaseI (Fa. Promega, Mannheim)) auf die Säule gegeben und diese 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Dnase stop mix zugegeben und nochmals wie beschrieben zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, bevor 600 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben wurden und wie beschrieben zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde nochmals mit 250 µl Waschpuffer wiederholt.

Danach wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die RNA eluiert, indem 100 µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei) auf die Säule gegeben und nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert wurde.

Die Konzentration der präparierten RNA wurde mittels eines Nanodrop ND-1000 Spectrophotometers (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für das Umschreiben der RNA in markierte cDNA für die MicroArray-Analyse wurde das Amersham CyScribe Microarray labeling Kit (Fa. GE Healthcare, Freiburg ) verwendet. Der erste Schritt war das *Primer annealing*. Hierzu wurden Ansätze aus 5 µg RNA, 1 µl *random nonamers* und H<sub>2</sub>O (RNase-frei) bis zu einem Gesamtvolumen von 11 µl pipettiert, die dann für 5 min bei 70°C inkubiert wurden. Die Ansätze wurden dann für 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt, dann folgte eine Zentrifugation für 30 sec bei 13.000 rpm und Raumtemperatur. Als Nächstes folgte die reverse Transkription in der *extension reaction*. Hierzu wurden folgende Bestandteile zu dem RNA-Eluat zugegeben:

4µl	5x CyScript buffer
2µl	0,1 M DTT
1µl	<i>dCTP nucleotide mix</i>
1µl	<i>dCTP CyDye-labelled nucleotides</i>
1µl	<i>CyScript reverse transcriptase</i>

Jede RNA wurde sowohl mit dem Cy3- als auch mit dem Cy5-Farbstoff markiert.

Die Ansätze wurden durch vortexen gemischt und für 30 sec bei 13.000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert, bevor sie für 90 min bei 42°C inkubiert wurden. Anschließend wurden sie bis zur Aufreinigung auf Eis gelagert.

Zur Aufreinigung wurde zunächst die RNA in der Probe abgebaut. Hierzu wurden 2 µl NaOH (2,5 M) zugegeben und die Proben nach kurzem vortexen für 30 sec bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, bevor eine Inkubation für 15 min bei 37°C folgte. Danach wurden 10 µl HEPES (2M) zugegeben und nach gründlichem Mischen wiederum wie beschrieben zentrifugiert.

Die eigentliche Aufreinigung erfolgte mittels des CyScribe GFx Purification Kits (Fa. GE Healthcare, Freiburg ) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die cDNA-Konzentration und die Markierungseffizienz mittels eines Nanodrop ND-1000 Spectrophotometers (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) überprüft.

Stop-Lösung:

Phenol	5% (v/v)
Ethanol	95% (v/v)

### 3.6.13. MicroArray-Analysen

Die MicroArray-Analysen wurden durch die MicroArray Core Facility des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie, Berlin, durchgeführt und durch Kai Papenfort, AG RNA-Biologie des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie, Berlin, ausgewertet.

### 3.6.14. Markierung von RNA mittels <sup>32</sup>P-γ-ATP für EMSA

RNA wurde mittels *in vitro*-Transkription (siehe 3.6.3) generiert und mittels eines Nanodrop ND-1000 Spectrophotometers (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) quantifiziert. 20 pMol RNA wurden mit H<sub>2</sub>O (RNase-frei) auf ein Volumen von 17 µl gebracht und für 1 min bei 95°C denaturiert. Nach einem Abkühlen auf Eis für 5 min wurden 2 µl B7003-S-Puffer (Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main) sowie 1 µl CIP (Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main) zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 90 µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei) sowie 160 µl P:C:I-Lösung. Der Ansatz wurde kurz gevortext und dann in ein PLG-Röhrchen (Phase Lock Gel, Fa. 5 PRIME, Hamburg) überführt. Nach einer Zentrifugation für 12

min bei 13.000 rpm und 15°C wurde die obere Phase der Probe in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1,1 µl GlycoBlue 15 mg/ml (Fa. Ambion, Austin) versetzt. Nach Zugabe von 5 µl 3 M Natriumacetat und 300 µl EtOH 100% (reinst) erfolgte eine Inkubation bei -20°C über Nacht zum Fällern der RNA.

Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C, dann wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 100 µl eiskaltem EtOH 70% (reinst) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das Pellet getrocknet.

Anschließend wurde die RNA in 16 µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei) aufgenommen und für 5 min bei 65°C gelöst. Es folgte eine Bestimmung der Konzentration mittels eines Nanodrop ND-1000 Spectrophotometers (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die dephosphorylierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Markierung mit <sup>32</sup>P wurden die CIP-behandelten RNAs auf Eis aufgetaut und für 1 min bei 95°C denaturiert. Nach einem Abkühlen auf Eis für 10 min wurden dem Ansatz 2 µl <sup>32</sup>P-γ-ATP, 10 µl PNK-Puffer (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) und 1 µl T4-Polynukleotid Kinase (PNK, Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) zugesetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 20 µl Ladepuffer II versetzt und in einem 6% Polyacrylamid-Gel (7 M Harnstoff, TBE) bei 300 Volt aufgetrennt.

Die gewünschte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in 750 µl RNA-Elutionspuffer über Nacht bei 4°C gelöst.

Der Ansatz wurde für 1 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in einem frischem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 750 µl P:C:I gemischt. Anschließend wurde der Ansatz in ein PLG-Röhrchen (Fa. 5 PRIME, Hamburg) überführt und für 12 min bei 13.000 rpm und 15°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und jede Probe mit 1 ml EtOH 100% (reinst) gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert.

Nach einer weiteren Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C wurde der Überstand entfernt und das Pellet getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 25 µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei) aufgenommen und für 5 min bei 65°C gelöst. Die Konzentration wurde mittels eines Nanodrop ND-1000 Spectrophotometers (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Die so generierten RNAs wurden in EMSA (siehe 3.8.2.) verwendet

P:C:I :

Phenol	50%
Chloroform	48%
Isoamylalkohol	2%

Ladepuffer II:

Formamid	95%
SDS	0,025%
EDTA	18 mM
Bromphenolblau	0,01%

RNA-Elutionspuffer:

Natriumacetat	0,1 M
SDS	0,1%
EDTA	10 mM

### **3.7. Präparation und Nachweis von Proteinen**

#### 3.7.1. Präparation cytoplasmatischer Proteine aus *E. coli*

Die entsprechenden Stämme wurden in 5 ml des gewünschten Mediums über Nacht bei 37°C und 180 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurde das gewünschte Volumen Medium der Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert und bei 37°C und 180 rpm unter Agitation inkubiert, bis die gewünschte OD<sub>600</sub> erreicht wurde.

Für vergleichende SDS-PAGE (siehe 2.7.6.) wurden Äquivalente zu einer OD<sub>600</sub> von 1 durch Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen und die Pellets bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Für die SDS-PAGE wurden diese Pellets in 200 µl 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen.

Für den Aufschluss per Ultraschall, beispielsweise für die Überprüfung der Löslichkeit eines heterolog überexprimierten Proteins (siehe 3.7.2.), wurden die Proben wie zuvor beschrieben geerntet und in ZAP aufgenommen. Der Aufschluss erfolgte in einem UP

200s Ultraschallprozessor (Fa. Dr. Hielscher, Stuttgart) für 10 Sekunden bei 80 Watt mit einem Intervall von 0,5 sec. Diese Behandlung wurde vier Mal wiederholt. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurde die Probe jeweils für 1 Minute in Eiswasser abgekühlt. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurde die Suspension für 30 min bei 4 °C und 13.000 rpm in einem Heraeus #75003328-Rotor (Fa. Kendro Laboratory Products, Langenselbold) zentrifugiert.

Um Rohzellextrakte für die Aufreinigung His-Tag-tragender Proteine zu erhalten, wurde die entsprechende Transformante in 50 ml LB-Medium (siehe 2.2.1.) über Nacht bei 37°C und 180 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurde 1 l LB-Medium der auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert und bei 37°C und 180 rpm unter Agitation inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,6 erreicht wurde. Die Expression des His-Tag-tragenden Proteins wurde dann durch Zugabe von 0,1 – 1 mM IPTG induziert und die Inkubation für 1 h fortgeführt. Es folgte die Ernte der Kultur durch Zentrifugation für 15 min bei 5.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 ml ZAP aufgenommen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 15 min bei 5.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für den Zellaufschluß mittels French Press wurden diese Pellets in 10 ml ZAP aufgenommen. Es folgten zwei Durchgänge in einer SLM Aminco 2-FA-078-E1 French Press (Fa. G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd) in einer Standardzelle (20 ml) bei 1.000 psi. Zur Entfernung von Zelltrümmern erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 5.000 rpm in einem Heraeus #75007590-Rotor (Fa. Kendro Laboratory Products, Langenselbold), gefolgt von einer Ultrazentrifugation für 60 min bei 40.000 rpm und 4°C in einer Sorvall Ultra pro 80 (Fa. Beckman, München) oder in einer Sorvall OTD 50B (Fa. Beckman, München) in einem Ti60-Rotor.

ZAP (pH 7,4):

Tris	10 mM
NaCl	200 mM
H <sub>2</sub> O (bidest)	ad 500 ml



5x SDS-Ladepuffer:

$\beta$ -Mercaptoethanol	16% (v/v)
SDS	5% (w/v)
Bromphenolblau	0,2% (w/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	200 mM
Glycerin	50% (v/v)

### 3.7.2. Optimierung der Expression heterologer Proteine in *E. coli*

Um die optimalen Bedingungen für die Expression des Proteins zu ermitteln, wurde das Expressionsniveau von Kulturen überprüft, die unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert wurden. Für die Optimierung der exprimierten Proteinmenge wurden Kulturen für unterschiedliche Zeiträume und mit unterschiedlichen Mengen IPTG induziert. Hierbei wurde als Induktionszeitpunkt das Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 gewählt. Getestet wurden IPTG-Endkonzentrationen von 0,1 mM, 1 mM und 10 mM. Des Weiteren wurde die Expression der heterologen Proteine über die Zeit verfolgt, um zu überprüfen, ob sich das exprimierte Protein in der Zelle anreichert oder eventuell einer Degradation unterliegt. Hierzu wurden die Expressionsniveau 30 min, 1 h und 3 h nach Induktion verglichen. Abschließend wurde überprüft, ob das heterolog exprimierte Protein in einer löslichen Form oder als *inclusion bodies* vorliegt. Hierzu wurden die Proben auf eine Zellzahl normalisiert, die der in 1 ml Kultur bei OD<sub>600</sub> 0,6 entspricht. Dies geschah über die Formel:

$$\frac{OD_{600}}{0,6} * 1000\mu l = x \mu l$$

Um lösliches und unlösliches Protein unterscheiden zu können, wurden zwei Proben genommen, von denen eine dem errechneten normalisierten Probenvolumen entsprach, die andere dem doppelten errechneten normalisierten Probenvolumen. Die erste Probe wurde direkt abzentrifugiert und das Pellet in 50  $\mu$ l 5x SDS-Ladepuffer aufgenommen, während letztere in 100  $\mu$ l ZAP aufgenommen wurde und per Ultraschall aufgeschlossen wurde (siehe 3.7.1.), um nur die lösliche Fraktion der Proteine zu präparieren.

5x SDS-Ladepuffer:

$\beta$ -Mercaptoethanol	16% (v/v)
SDS	5% (w/v)
Bromphenolblau	0,2% (w/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	200 mM
Glycerin	50% (v/v)

### 3.7.3. Aufreinigung von His-Tag-tragenden Proteinen mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulen

Zur Aufreinigung von Proteinen mit einem Decahistidin-Sequenz wurden Poly-Prep-Chromatographie-Säulchen (Fa. Bio-Rad, München) verwendet. Dabei wurde die Säule zunächst mit 6 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA Superflow (Fa. Qiagen, Hilden) beladen und mit ZAP äquilibriert. Dann wurden 20 ml Proteinrohextrakt (siehe 3.7.1.) auf die Säule geladen. Es folgten Waschschrte mit zweimal 10 ml ZAP +50 mM Imidazol und einmal 10 ml ZAP(+100 mM Imidazol, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu waschen.

Die Elution der His-Tag-tragenden Proteine von der Säule erfolgte mit je 6 ml ZAP steigender Imidazolkonzentrationen (200 mM, 300 mM und 500 mM). Die dadurch erhaltenen Fraktionen wurden mittels denaturierender Proteingelektrophorese auf Zusammensetzung und Reinheit überprüft (siehe 3.7.5.). Die aufgereinigten His-Tag-tragenden Proteine wurden anschließend einer Dialyse unterzogen (siehe 3.7.4.).

ZAP (pH 7,4):

Tris	10 mM
NaCl	200 mM
H <sub>2</sub> O (bidest)	ad 500 ml

### 3.7.4. Dialyse von Proteinen

Bei der Aufreinigung eines Proteins über eine N-terminale Decahistidin-Sequenz ist Imidazol zum Ablösen des an die Säule gebundenen Proteins notwendig, welches weitere Versuche mit dem aufgereinigten Protein negativ beeinflussen kann. Um diese Stoffe aus der Proben zu entfernen, wurden die Elutionsfraktionen in einem Membran-Cell Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa (Fa. Serva, Heidelberg)

gegen Glycerinpuffer mit DTT dialysiert. Der Dialyseschlauch wurde vor dem Beladen mit Protein zweimal in 500 ml H<sub>2</sub>O (bidest) mit 500 µl 0,5 M EDTA aufgeköcht. Das Volumen des Dialysepuffers betrug mindestens das 500fache der zu dialysierenden Proteinlösung und jede Dialyse wurde für mindestens 16 h bei 4°C unter Rühren durchgeführt.

Glycerinpuffer:

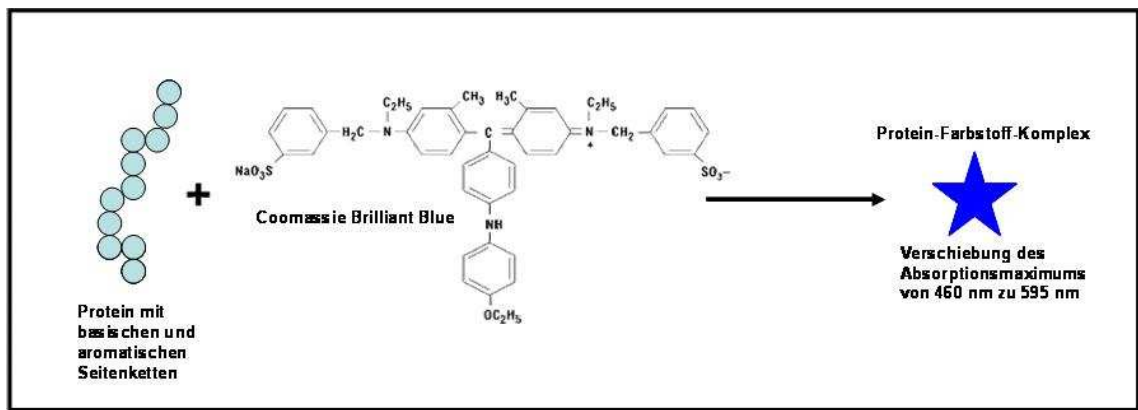
Glycerin	25% (v/v)
KCl	100 mM
Tris	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT	5 mM

ZAP (pH 7,4):

Tris	10 mM
NaCl	200 mM
H <sub>2</sub> O (bidest)	ad 500 ml

### 3.7.5. Proteinmengenbestimmung (Bradford 1976)

Diese Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren eines Proteins im sauren Milieu. Hierbei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (vor der Bindung an ein Protein) zu 595 nm (nach der Bindung an ein Protein). Abb. 3.3. zeigt ein Schema dieser Reaktion. Für die Proteinbestimmung wurde Roti-Quant-Lösung (Fa. Roth, Karlsruhe) verwendet. Für jede Probe wurden 780 µl, 790 µl und 795 µl H<sub>2</sub>O (bidest) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und mit der zu bestimmenden Proteinlösung auf 800 µl aufgefüllt. Als Referenz diente ein Ansatz mit 800 µl H<sub>2</sub>O (bidest) ohne Protein. Anschließend wurden 200 µl Roti-Quant-Lösung hinzugegeben, die Ansätze gründlich gemischt und unter gelegentlichen Schütteln für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm mit Hilfe eines Ultrospec 2100 pro-Photometers (Fa. Amersham, Freiburg) oder eines V-530 UV/VIS Spectrophotometers (Fa. Jasco, Gotha) gemessen.



**Abb. 3.3.: Schema der Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford**

In saurer Umgebung interagiert der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue mit basischen und aromatischen Seitenketten bestimmter Aminosäuren. Durch diese Interaktion kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Stoffes von 480nm zu 595nm. Diese Verschiebung ist direkt proportional zur Konzentration der entsprechenden Aminosäuren und somit auch zum Proteingehalt der Probe

Anhand einer mit definierten Mengen Rinderserum-Albumin erstellten Eichkurve wurde folgende Formel für die Berechnung der Proteinkonzentration aufgestellt :

$$\frac{(A_{595} * 0,0536 \mu g)}{\mu l \text{ Probe}} = c$$

mit A<sub>595</sub> Absorption bei 595 nm  
 c Proteinkonzentration in µg/µl

### 3.7.6. Denaturierende Proteingelektrophorese

#### 3.7.6.1. Vorbereitung der Proben

Zellextrakte wurden mittels Proteinmengenbestimmung nach Bradford quantifiziert (siehe 3.7.5.) und äquivalente Proteinmengen in H<sub>2</sub>O (bidest) mit 5x SDS-Ladepuffer gemischt. Alternativ wurden übereinstimmende OD<sub>600</sub>-Einheiten verwendet (siehe 3.7.1.). Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 94°C denaturiert. Die verwendeten Proteinmengen sind an entsprechender Stellen vermerkt. Zur Größenbestimmung wurden 10 µl Unstained Protein Molecular Weight Marker oder Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet, der ebenso denaturiert wurde. Nicht durch Proben belegte Taschen wurden mit dem Probenvolumen entsprechenden Mengen 1x SDS-Ladepuffer gefüllt.

5x SDS-Ladepuffer:

$\beta$ -Mercaptoethanol	16% (v/v)
SDS	5% (w/v)
Bromphenolblau	0,2% (w/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	200 mM
Glycerin	50% (v/v)

3.7.6.2. Herstellung denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gele

Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gele wurden wie unten angegeben angesetzt. Nach Mischen der Bestandteile wurde zunächst das Trenngel in den vorbereiteten Gießständen der verwendeten Laufapparatur gegossen und mit Isobutanol überschichtet, um eine waagerechte Fläche zu erhalten. Nachdem das Trenngel ausgehärtet war, wurde das Isobutanol entfernt, das Gel mit H<sub>2</sub>O (bidest) gespült und die Oberfläche vorsichtig getrocknet.

Dann wurde das Sammelgel angesetzt, gegossen und ein Kamm eingesetzt. Mini-Gele mit einer Höhe von 7,3 cm und einer Breite von 8 cm wurden in Mini-PROTEAN 3 Cell-Apparaturen (Fa. Bio-Rad, München) gegossen, große Gele mit einer Höhe und Breite von 16 cm in einer SE 400 oder SE 600 Vertical Unit (Fa. Hoefer, San Francisco, USA).

Sofern nicht anders angegeben wurden 12,5%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet.

Für 15 ml Sammelgel:

1 M Tris/HCl pH6.8	1.8 ml
AA/Bis 29:1 (40%)	1.875 ml
H <sub>2</sub> O	11.18 ml
10 % SDS	150 $\mu$ l
Ammoniumpersulfat (10%)	150 $\mu$ l
TEMED	15 $\mu$ l

Für 25 ml Trenngel:

1.5 M Tris/HCl pH 8.7	6.25 ml
AA/Bis 29:1 (40%)	7.81 ml
H <sub>2</sub> O	10.69 ml
10 % SDS	250 µl
Ammoniumpersulfat (10%)	250 µl
TEMED	25 µl

Bei Verwendung von Mini-PROTEAN 3 Cell-Apparaturen (Fa. Bio-Rad, München) wurden die verwendeten Mengen halbiert (ausreichend für 2 Mini-Gele).

### 3.7.6.3. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in Mini-PROTEAN 3 Cell-Apparaturen (Fa. Bio-Rad, München) bzw. SE 400 oder SE 600 Vertical Unit (Fa. Hoefer, San Francisco, USA) bei 120-180 Volt in 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers das untere Ende des Gels erreichte.

5x Laufpuffer:

Tris	25 mM
NaCl	250 mM
SDS	0,1% (w/v)

### 3.7.6.4. Färbung mittels Coomassie Brilliant Blue R

Nach dem Lauf wurden die Gele aus den Apparaturen entnommen und für mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung auf dem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Gele kurz mit H<sub>2</sub>O (bidest) gespült und für 30 min in Entfärber I auf dem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie in Entfärber II auf die selbe Art inkubiert, bis sie ausreichend entfärbt waren. Gele wurden mittels eines CanoScan 5.000F-Scanners (Fa. Canon, Krefeld) dokumentiert und gegebenenfalls getrocknet. Hierzu wurde das Gel auf zwei Lagen mit H<sub>2</sub>O (bidest) gewässerten Whatman-Papier transferiert und mit befeuchteter „Alba

Einmach-Haut“ (Fa. Gehring & Neiweiser, Bielefeld) abgedeckt. Anschließend wurde das Gel für 2 h in einem Model 583 gel dryer (Fa. Bio-Rad, München) getrocknet.

Coomassie-Färbelösung:

Ethanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R	0,25% (w/v)

Entfärber I:

Ethanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

Entfärber II:

Ethanol	20% (v/v)
Essigsäure	5% (v/v)

### 3.7.7 Western Blot Analyse

#### 3.7.7.1. Herstellung polyklonaler Antikörper

Polyklonale Antikörper aus Kaninchen gegen His(10)-YhbJ wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) hergestellt. Es wurde ein erweitertes Immunisierungsschema mit vier Boost-Schritten angewendet. Hierbei wurde dem Tier zunächst vor der ersten Injektion 5 ml Präimmun-Serum zur Untersuchung auf Kreuzreaktionen abgenommen. Danach erfolgte die erste Injektion des Antigens, welche nach 21, 49 und 65 Tagen wiederholt wurde. Für jede Antigen-Injektion wurden 400 µg His(10)-YhbJ in ZAP verwendet. Blutentnahmen fanden an den Tagen 35, 53 und 70 nach der ersten Antigen-Injektion statt. Die Entblutung des Tieres erfolgte am Tag 82 nach der ersten Antigen-Injektion. Die Blutproben wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 3.7.7.2. Aufreinigung des Antikörpers

Um das Vorkommen von Kreuzreaktionen zu minimieren, wurde eine Aufreinigung des Antikörpers vorgenommen. Bei dieser sollen nicht YhbJ-spezifische Antikörper durch

Bindung an Proteine in Lösung titriert werden, um ihre Reaktion mit an der PVDF-Membran gebundenen Proteinen zu verhindern.

Hierzu wurden 1 l LB-Medium aus einer Vorkultur des *yhbJ*-Deletionsstammes Z37 (siehe Tabelle 7.1.) zu einer OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1 bei 37°C unter Agitation in einem 2 l-Schikanekolben inkubiert. Das Äquivalent zu 100 OD<sub>600</sub>-Einheiten wurde durch Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm, 4°C) geerntet und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml ZAP (pH 7,4) aufgenommen und die Zellen mittels Sonifizierung (5x 30 Pulse á 1 sec, vergleiche auch 3.7.1.) aufgeschlossen. Durch eine weitere Zentrifugation wie beschrieben wurden Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in ein steriles Plastikröhrchen überführt, mit 100 µl primären Antikörper ( $\alpha$ -YhbJ) gemischt und 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bis zur Nutzung bei 4°C gelagert. In Western Blot Analysen wurde der aufgereinigte Antikörper 1:100 in Blotto verdünnt eingesetzt (siehe 3.7.7.3.)

### 3.7.7.3. Transfer und Detektion

Für Western Blot Analysen wurden die Proteinproben zunächst per denaturierender Proteingelelektrophorese wie unter 3.7.6. beschrieben aufgetrennt. Die Übertragung der Proteine auf eine Immun-Blot PVDF-Membran (Fa. Bio-Rad, München) erfolgte in einer Semiphor Transpher Unit (Fa. Amersham, Freiburg) oder eine Semi-dry Blotting Apparatur Fa. Waase-Tech, Göttingen).

Die Nitrocellulose-Membran wurde kurz in 100 % Methanol aktiviert und die Polyacrylamid-Gele in Transferpuffer gewaschen, und die Elektroden der Apparatur wurden mit H<sub>2</sub>O (bidest) befeuchtet. Auf drei Lagen entsprechend zugeschnittenem und mit Transferpuffer befeuchteten Whatman-Papiers wurde zunächst die aktivierte Nitrocellulose-Membran und dann das Polyacrylamid-Gel gelegt, welches mit drei weiteren Lagen befeuchteten Whatman-Papiers abgedeckt wurde. Der Transfer der Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf die Membran erfolgte für 1 h bei 60 mA.

Anschließend wurde die Membran in eine Plastikschaale mit Blotto überführt, in der sie über Nacht auf einem Horizontalschüttler bei 40 rpm inkubiert wurde. Die Polyacrylamid-Gele wurden zur Kontrolle der Vollständigkeit des Transfers wie unter 3.7.6.4. beschrieben einer Coomassie-Färbung unterzogen.

Die Membranen wurden dann für 3 h in Blotto mit primären Antikörper beziehungsweise Präimmun-Serum (10.000:1) oder Blotto mit dem Ansatz zur



Aufreinigung der Antikörper (siehe 3.7.7.2., 100:1) auf einem Horizontalschüttler mit 40 rpm inkubiert und anschließend drei Mal für 30 Minuten in Blotto gewaschen.

Daraufhin wurde die Membran für weitere 30 min in Blotto mit dem sekundären Antikörper Anti Rabbit IgG (FC) AP Conjugate (Fa. Promega, Mannheim) im Verhältnis 100.000:1 auf einem Horizontalschüttler mit 40 rpm inkubiert und anschließend drei Mal für 20 min in Blotto gewaschen.

Die Membran wurde mit H<sub>2</sub>O (bidest) abgespült und für 5 min in Puffer III gewaschen, bevor sie für 5 Minuten in Puffer III mit dem Chemilumineszenz-Substrat CDP Star (Fa. Roche, Mannheim) im Verhältnis 100:1 inkubiert wurde.

Die Lumineszenz wurde dann über einen Zeitraum von 20 min und 45 min in einem Chemi-Smart 5.000 Chemilumineszenz-System (Fa. PeqLab, Erlangen) unter Verwendung der zugehörigen ChemiCapt 11.07-Software dokumentiert.

Transferpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	15 %

10x TBS (pH 7,6):

Tris	500 mM
NaCl	1,5 M

Blotto:

10x TBS	1x
Tween 20	0,1 %
Magermilchpulver	2,5 % (w/v)

Puffer III (pH 9,5):

Tris	100 mM
NaCl	100 mM

### 3.8. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) (Garner und Revzin 1981)

Der EMSA ist eine Methode, bei der die Interaktion zwischen Polynukleotiden (sowohl RNA wie auch DNA) und Proteinen untereinander bestimmt werden kann. Hierzu werden Ansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen der potenziellen Interaktionspartner inkubiert und anschließend mittels nativer, also nicht-denaturierender, Gelelektrophorese aufgetrennt. Falls die Komponenten miteinander interagieren, so ist ihr Laufverhalten im Komplex deutlich vom Laufverhalten der einzelnen Komponenten zu unterscheiden.

#### 3.8.1. EMSA mit nicht-markierter RNA

##### 3.8.1.1. Native Polyacrylamid-Gele

Die Gele für EMSA wurden in Mini-PROTEAN 3 Cell-Apparaturen (Fa. Bio-Rad, München) gegossen. Es gibt im Gegensatz zur SDS-PAGE (siehe 3.7.6.) keine unterschiedlichen Sammel- und Trenngele.

Ansatz für 20 ml:

10x TBE	2 ml
AA/Bis 19:1 (40%)	3 ml
H <sub>2</sub> O	15 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	200 µl
TEMED	20 µl

10x TBE:

Tris	900 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	25 mM

##### 3.8.1.2. Vorbereitung der Proben

Zunächst wurde das Molekulargewicht der verwendeten RNAs errechnet, wobei davon ausgegangen wurde, dass ein kb einzelsträngiger RNA ein Gewicht von  $3,4 \times 10^5$  Da hat. Anschließend wurde ein 12x-Mastermix für 30 pMol beziehungsweise 50 pMol

RNA in 2x Strukturpuffer und einem Gesamtvolumen von 96  $\mu$ l mit H<sub>2</sub>O (RNase-frei) angelegt. Diese Ansätze wurden für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Währenddessen wurden aufsteigende Konzentrationen von His(10)-YhbJ in H<sub>2</sub>O (RNase-frei) mit einem Gesamtvolumen von 8  $\mu$ l vorgelegt, im Bereich von 0 pMol bis 40 pMol Protein, wenn 30 pMol RNA pro Ansatz verwendet wurde, und von 0 pMol bis 150 pMol Protein, wenn 50 pMol RNA eingesetzt wurden.

Nach dem Abkühlen der denaturierten RNA auf Eis wurden 8  $\mu$ l des RNA-Masternix zu jeder vorgelegten Protein-Konzentration gegeben, und die Ansätze für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 4  $\mu$ l 50% Glycerin (in H<sub>2</sub>O (RNase-frei)) zu den Ansätzen gegeben und diese vorsichtig auf ein natives Polyacrylamid-Gel geladen (siehe 3.8.1.1.) und wie unter 3.8.1.3. beschrieben aufgetrennt und analysiert.

Strukturpuffer:

Tris-HCl (pH 7)	100 mM
KCl	1 M
MgCl <sub>2</sub>	100 mM

### 3.8.1.3. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgte in Mini-PROTEAN 3 Cell-Apparaturen (Fa. Bio-Rad, München). Die Gele wurden mit 1x TBE überschichtet und es erfolgte ein Vorlauf für 15 min bei 50 Volt, um die Gele zu äquilibrieren.

Nach dem Beladen der Gele mit EMSA-Proben (siehe 2.8.1.2.) erfolgte ein Lauf der Gele für 2-3 h bei 50 Volt und Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Gele aus der Apparatur entnommen, für 2-3 min in einem Ethidiumbromid-Wasserbad gefärbt, kurz in H<sub>2</sub>O gespült und mittels direkt unter UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm in einer Gel Doc 2.000-Anlage (Fa. Bio-Rad, München) dokumentiert.

10x TBE:

Tris	900 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	25 mM

### 3.8.2. EMSA mit $^{32}\text{P}$ -markierter RNA

#### 3.8.2.1. Native Polyacrylamid-Gele für EMSA mit $^{32}\text{P}$ -markierter RNA

Die Gele für EMSA mit  $^{32}\text{P}$ -markierter RNA wurden in einer SE 600 Vertical Unit (Fa. Hoefer, San Francisco) gegossen. Es gibt im Gegensatz zur SDS-PAGE (siehe 3.7.6.) keine unterschiedlichen Sammel- und Trenngele.

Ansatz für 100 ml:

10x TBE	10 ml
AA/Bis 19:1 (40%)	15 ml
H <sub>2</sub> O	75 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	1 ml
TEMED	100 µl

10x TBE:

Tris	900 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	25 mM

#### 3.8.2.2. Vorbereitung der Proben

Zunächst wurde ein 4x *upper mix* mit je 4 nM  $^{32}\text{P}$ -markierter RNA sowie 100 nM HefetRNA pro Ansatz in einem Volumen von 18 µl mit H<sub>2</sub>O (RNase-frei) angelegt, für 1 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt, bevor 2 µl 10x Strukturpuffer (Fa. Ambion, Austin) zugesetzt wurden.

Es wurden zudem drei unterschiedliche *lower mixes* in jeweils 5 µl Volumen angesetzt: Zunächst 1x Strukturpuffer ohne Protein, dann 4 nM His(10)-YhbJ in 1x Strukturpuffer und schließlich 40 nM His(10)-YhbJ in 1x Strukturpuffer.

Je 5 µl des 4x *upper mix* wurden zu einem der *lower mix*-Ansätze gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Strukturpuffer:

Tris-HCl (pH 7)	100 mM
KCl	1 M
MgCl <sub>2</sub>	100 mM

### 3.8.2.3. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgte in einer SE 600 Vertical Unit (Fa. Hoefer, San Francisco). Die Gele wurden mit 1x TBE überschichtet und es erfolgte ein Vorlauf für 30 min bei 300 Volt und 120 A, um die Gele zu äquilibrieren.

Die Proben wurden nach Ablauf der unter 3.8.2.2. beschriebenen Inkubation mit 3 µl nativem Ladepuffer gemischt und unter Spannung aufgetragen. Der Lauf der Gele erfolgte für 2 h bei 300 Volt, 120 A und 4°C.

Anschließend wurden die Gele aus der Apparatur entnommen, für 1 h mittels eines Model 583 gel dryer (Fa. Bio-Rad, München) getrocknet (vergleiche 2.7.6.4.) und für 2 h auf einen Molecular dynamics GP Storage Phosphor-Schirm (Fa. GE Healthcare, Freiburg) aufgelegt und die Strahlung der radioaktiv-markierten Sonden und des Markers mittels eines FujiImager BAS (Fa. Fuji, Düsseldorf) ausgewertet.

10x TBE:

Tris	900 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	25 mM

## **3.9. Computergestützte Datenanalyse von DNA- und Proteinsequenzen und Literaturrecherche**

Für *E. coli* wurde die Genomdatenbank EcoCyc unter <http://www.ecocyc.org> genutzt.

Die Analyse von Aminosäure-Sequenzen wurden mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tool* BLAST (Altschul *et al.* 1990) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> und des *Simple Modular Architecture Research Tool* SMART (Schultz *et al.* 1998) unter <http://smart.embl-heidelberg.de/> durchgeführt. Konservierte Motive wurden mittels MEME version 3.5.7. ermittelt (Bailey *et al.* 2006).

RNA-Bindedomänen wurden mittels RNABindR vorhergesagt (Terribilini *et al.* 2007). Für phylogenetische Analysen wurde ebenfalls die Datenbank MicrobesOnline unter <http://www.microbesonline.org> genutzt.

Desweiteren wurden die Programme ClustalW (Thompson *et al.* 1994; Larkin *et al.* 2007) unter <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> und WebLogo (Crooks *et al.* 2004) unter <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> verwendet sowie BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) und TreeView 1.6.6. (Copyright R.D.M Page 2001) .

Die Verarbeitung von DNA-Sequenzen wurde mit Hilfe des Programmes CHROMAS (Conor MacCarthy, Southport) durchgeführt, virtuelle Klonierungen und Sequenzanalysen mittels VectorNTI (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Für die Literaturrecherche wurde PubMed (National Institutes of Health, Bethesda, USA) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed> sowie die Datenbank EcoCyc (siehe oben) genutzt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Die Regulation der *glmS*-Expression in *Escherichia coli*

Vorherige Analysen zeigten, dass eine Deletion von *yhbJ* zu einer starken Überexpression des Gens der Glukosamin-6-Phosphat-Synthase *GlmS* führt sowie zu einer Akkumulation einer *glmS*-spezifischen mRNA.

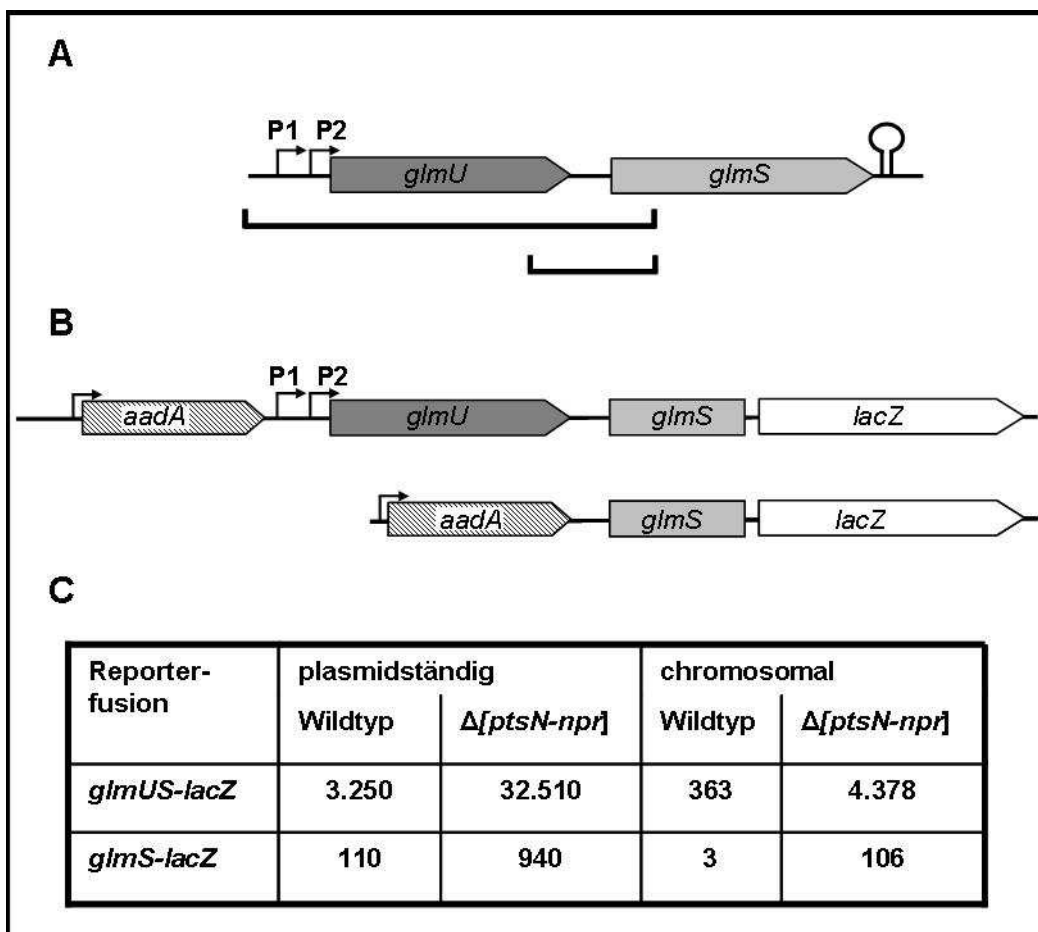
#### 4.1.1. Transposonmutagenese und Charakterisierung der Mutanten

Um weitere an der Regulation der *glmS*-Expression beteiligte Faktoren zu identifizieren, wurde eine Transposon-Mutagenese unter Verwendung des Transposons *mTn10* durchgeführt (siehe 2.3.5.). Diese beruht auf der Transposition des plasmidständigen Transposons und der zufälligen Integration des Elementes in das Genom der Zelle.

Für diese Analysen wurden der Wildtyp Z8 und der *yhbJ*-Deletionsstamm Z28 verwendet (siehe Tabelle 7.1.). Diese tragen beide eine *glmS-lacZ*-Reporterfusion, die in das Chromosom integriert ist. Wie in Abb. 4.1. dargestellt handelt es sich hierbei um ein Konstrukt, in dem die Expression von *glmS* und des stromaufwärts gelegenen intergenischen Bereiches vom konstitutiven Promotor des *aadA*-Resistenzgens aus erfolgt. Diese Resistenzkassette besitzt zwar einen schwachen Terminator, jedoch kommt es dennoch zu einer signifikanten Expression der Reporterfusion. Dadurch eignet sich dieses Konstrukt besonders zur Untersuchung der posttranskriptionellen Regulation von *glmS*.

Um Messungen mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Assay zu ermöglichen, ist in diesen Stämmen zudem das authentische, chromosomale *lac*-Operons deletiert, und das Gen des Lac-Respressor, *lacY*, wurde nachträglich über das F-Plasmid wieder eingefügt.

In Abb. 4.1. ist die im Wildtyp und in einem  $\Delta yhbJ$ -Stamm gemessene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität dargestellt. Der Wildtyp-Stamm weist für die hier verwendete chromosomale *glmS-lacZ*-Fusion eine geringe Aktivität von 3 Miller units auf, während die Aktivität in Abwesenheit von *yhbJ* um einen Faktor 35 höher ist (106 Miller units, vergleiche auch Abb. 4.3.).



**Abb. 4.1.:** Reporterfusionen zur Untersuchung der *glmS*-spezifischen Expression in *E. coli*

(A) Schematische Darstellung des *glmUS*-Operons in *E. coli*. P1 und P2 bezeichnen die beiden Promotoren, das Haarnadel-Symbol den Terminator des Operons (vergleiche 2.1.). Die Klammern unter der Abbildung markieren die an *lacZ* fusionierten Bereiche.

(B) Schematische Darstellung der *glmUS-lacZ*-Reporterfusion und der *glmS-lacZ*-Reporterfusion. Vor den Fusionen befindet sich die *aadA*-Resistenzkassette.

(C)  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *glmUS-lacZ*- und *glmS-lacZ*-Reporterfusionen (in Miller units). Es wurden der Wildtyp (R1279) und ein  $[ptsN-npr]$ -Deletionsstamm (R2413) mit Plasmiden, die die Reporterfusionen tragen (pBGG16 und pBGG17) transformiert, als auch Wildtyp (Z8 beziehungsweise Z9) und ein  $[ptsN-npr]$ -Deletionsstamm (Z5 beziehungsweise Z6) verwendet, bei denen die Reporterfusionen in das Chromosom integriert sind (siehe Tab. 7.2). Die Stämme und Transformanten wurde in LB-Medium bei 37°C auf einem Horizontalschüttler inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht wurde und anschließend die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt (siehe 3.3.4.).

Beide Reporterfusionen zeigen sowohl plasmidständig als auch integriert in das Chromosom eine stark erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Abwesenheit von *yhbJ*.

Der Wildtyp-Stamm Z8 wurde eingesetzt, um nach Transposonmutanten zu suchen, in denen die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität deutlich erhöht ist. In diesen Mutanten wurde durch die Transposition ein genetisches Element inaktiviert, dass sich negativ auf die *glmS*-spezifische Expression, und somit auf die Aktivität der *glmS-lacZ*-Reporterfusion, auswirkt (reprimierender Faktor).

Im Stamm Z28 ist die *glmS*-spezifische Expression aufgrund der Deletion von *yhbJ* entkoppelt (vergleiche 2.3.), was sich in der hohen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität



wiederspiegelt. In diesem Stamm wurde nach Transposonmutanten gesucht, deren  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität deutlich niedriger als im Ausgangsstamm ist. In diesen Mutanten wurde ein genetisches Element inaktiviert, dass sich positiv auf die *glmS*-spezifische Expression, und somit auch auf die *glmS-lacZ*-Reporterfusion, auswirkt (aktivierender Faktor).

Um eine große Zahl Transposonmutanten mit hohem Durchsatz untersuchen zu können, wurden die Transposonmutanten auf M9-Minimalmedium mit Glukose (siehe 3.2.2.) mit X-Gal plattiert. X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) wird durch die  $\beta$ -Galaktosidase gespalten, hierbei entstehen Galaktose und ein blauer Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo) (Sambrooke 2001). Alternativ wurde McConkey-Agar (siehe 2.2.3) verwendet. Dieser enthält Neutralrot als pH-Indikator, der eine Verwertung von Laktose durch einen Farbumschlag anzeigt (Sambrooke 2001). In beiden Fällen ist es möglich, entweder gefärbte Kolonien mit einer erhöhten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität vor einem Hintergrund ungefärbter Kolonien zu selektieren (Suche nach reprimierenden Faktoren), oder ungefärbte Kolonien mit einer erniedrigten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität vor einem Hintergrund gefärbter Kolonien zu suchen (Suche nach aktivierenden Faktoren).

Die Zielstämme wurden mit dem Plasmid pKESK18 transformiert (siehe 3.3.3.). Dieses trägt einen temperatursensitiven Replikationsursprung, der keine Replikation des Plasmids bei Temperaturen über 30°C zulässt, sowie ein Transposase-Gen unter Kontrolle eines ebenfalls temperaturabhängigen Promotors. Dadurch ist die Expression der Transposase nur bei einer Temperatur von 42°C möglich. Somit können Transformanten bei 30°C inkubieren werden, um eine Replikation des Plasmides zu gewährleisten, während eine Temperaturerhöhung diese verhindert, jedoch die Transposition aktiviert. Durch dieses System werden unerwünschte mehrfache Insertionen in das Genom verhindert.

Die transformierten Zielstämme wurden zunächst bei 30°C in LB-Medium (siehe 3.2.1.) mit Selektion auf Kanamycin- und Chloramphenicol-Resistenz (siehe 3.2.5.) inkubiert und in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,8) in Verdünnungen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  auf M9-Minimalplatten mit Glukose (siehe 3.2.2.) und X-Gal sowie auf McConkey-Lac-Platten (siehe 3.2.3.) jeweils unter Selektion auf Chloramphenicol-Resistenz ausplattiert und über Nacht bei 42°C inkubiert.

Zusätzlich wurden Verdünnungen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-7}$  auf M9-Minimalplatten mit Glukose und X-Gal und auf McConkey-Lac-Platten unter Selektion auf Kanamycin-Resistenz für die Lebendzellzahlbestimmung plattiert und bei 30°C inkubiert.

Wie beschrieben wurde im Wildtyp-Stamm Z8 nach Transposonmutanten gesucht, in denen die Insertion des Transposons in das Chromosom zu einer erhöhten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität führt. Hierzu wurden Kolonien untersucht, die im Gegensatz zum unbehandelten Wildtyp eine deutliche Färbung auf M9-Minimalmedium mit Glukose und X-Gal beziehungsweise McConkey-Agar aufwiesen.

Umgekehrt wurde im  $\Delta yhbJ$ -Stamm Z28 nach Mutanten gesucht, in denen die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Reporterfusion herabgesetzt ist, so dass entsprechende Kolonien auf M9-Minimalmedium mit Glukose und X-Gal oder McConkey-Agar keine oder eine deutlich schwächere Färbung aufweisen als der Ausgangsstamm Z28.

Entsprechende Kolonien wurden auf M9-Minimalplatten mit Chloramphenicol vereinzelt, um den Phänotyp zu verifizieren. Anschließend wurde die Insertionsstelle des Transposons mittels ST-PCR (siehe 3.5.2.) bestimmt sowie die Aktivität der Reporterfusion im Vergleich zu den Ursprungstämmen im  $\beta$ -Galaktosidase-Assay (siehe 3.3.4.) bestimmt.

Im Wildtyp wurden auf der Suche nach reprimierenden Faktoren der *glmS*-Expression etwa 240.000 Transposonmutanten untersucht. Die Mutagenese in diesem Stamm resultierte in 27 Mutanten, die reproduzierbar eine deutlich erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Reporterfusion aufwiesen. In einem Großteil der Mutanten war der Anstieg der Aktivität jedoch durch eine Integrationen des Plasmides in die Reporterfusion bedingt und für drei weitere Mutanten konnte die Insertionsstelle nicht bestimmt werden, da es sich Integrationen des gesamten pKESK18-Plasmides in das Genom handelte.

**Tabelle 4.1: Transposonmutanten im Wildtyp (Z8)**

Stamm	Genotyp	Richtung	Bemerkungen
Z8 TM 1	Z8 <i>glmS::mTn10 (cat)</i>	→→→	Insertion an Position -7
Z8 TM 2	Z8 <i>glmS::mTn10 (cat)</i>	→→→	Insertion an Position +5
Z8 TM 3	Z8 <i>glmS::mTn10 (cat)</i>	→→→	Insertion an Position -63
Z8 TM 7	Z8 <i>yhbJ::mTn10 (cat)</i>	→←→	Insertion an Position +678
Z8 TM 8	Z8 <i>yhbJ::mTn10 (cat)</i>	→→→	Insertion an Position -6, 3 unabhängige Mutanten gefunden
Z8 TM 9	Z8 <i>yhbJ::mTn10 (cat)</i>	→→→	Insertion an Position +756
Z8 TM 11	Z8 <i>yhbJ::mTn10 (cat)</i>	→→→	Insertion an Position (+716)

Die verbliebenen Transposonmutanten sind in Tabelle 4.1. aufgeführt. Sechs von ihnen trugen Insertionen des Transposons in *yhbJ*, die sich auf vier unterschiedliche

Insertionstellen verteilen und die den bekannten Effekt einer Inaktivierung von *yhbJ* auf die *glmS*-Expression widerspiegeln.

Die restlichen drei Transposonmutanten trugen Insertionen in oder nahe *glmS* selbst.

**Tabelle 4.2: Transposonmutanten im  $\Delta yhbJ$ -Hintergrund (Z28)**

Stamm	Genotyp	Richtung	Bemerkungen
Z28 TM1	Z28 <i>glmZ::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	→→→	Insertion an Position +10, 2 unabhängige Mutanten gefunden
Z28 TM2	Z28 <i>glmZ::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	→→→	Insertion an Position +6
Z28 TM3	Z28 <i>dgoT::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	←→←	Insertion an Position +26
Z28 TM4	Z28 <i>glmZ::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	→←→	Insertion an Position +12
Z28 TM5	Z28 <i>glmZ::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	→←→	Insertion an Position +84
Z28 TM6	Z28 <i>glmZ::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	→←→	Insertion an Position +16
Z28 TM7	Z28 <i>glmZ::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	→→→	Insertion an Position +74
Z28 TM8	Z28 <i>yjiR::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	←←←	Insertion an Position -166
Z28 TM9	Z28 <i>glmZ::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	→←→	Insertion an Position -59
Z28 TM10	Z28 <i>glmZ::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	→←→	Insertion an Position +30, 3 unabhängige Mutanten gefunden
Z28 TM11	Z28 <i>hemY::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	←→←	Insertion an Position +1067
Z28 TM12	Z28 <i>glmZ::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	→←→	Insertion an Position -88
Z28 TM13	Z28 <i>glmZ::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	→→→	Insertion an Position +83, 2 unabhängige Mutanten gefunden
Z28 TM15	Z28 <i>glmZ::mTn10</i> ( <i>cat</i> )	→→→	Insertion an Position -1

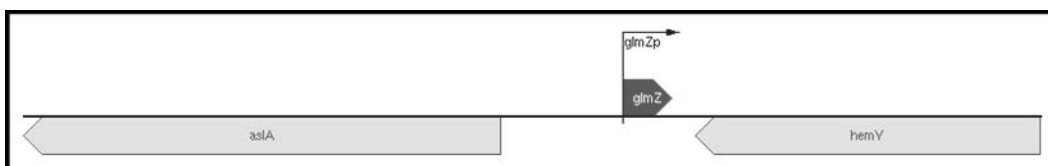
Die Suche nach aktivierenden Faktoren der Expression im  $\Delta yhbJ$ -Stamm Z28 resultierte in 26 Kolonien aus etwa 75.000 untersuchten Mutanten, die reproduzierbar eine deutlich geringere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Reporterfusion aufwiesen. Acht dieser Transposonmutanten trugen eine Insertion im *lacZ*-Gen der Reporterfusion.

Zwei weitere Transposonmutanten trugen Insertionen in *dgoT* beziehungsweise im Gen *yjiR*. Für beide Gene wurden Deletionsstämme mittels der unter 3.5.3. Methode generiert (resultierend in den Stämmen Z88 und Z90 sowie Z92 und Z94, siehe Tab. 7.1.), in denen jedoch kein Einfluß der Deletionen auf die *glmS*-Expression nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Der größte Anteil der Transposonmutanten jedoch trug Insertionen in oder nahe dem Gen *glmZ* (vormals *sraJ*), die sich auf 11 unterschiedliche Insertionsstellen verteilen (siehe Tabelle 4.2.).

#### 4.1.2. Untersuchung der Rolle von GlmZ

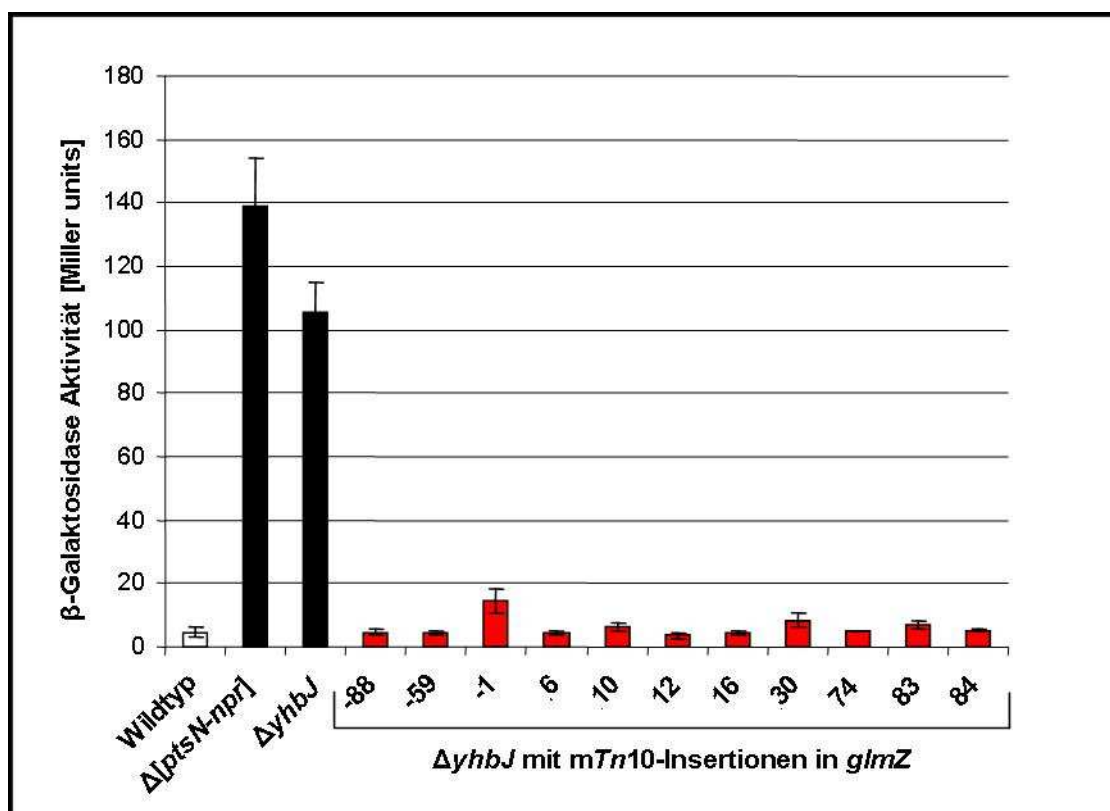
Das Gen *glmZ* liegt als monocistronische Einheit zwischen *aslA*, welches für eine Arylsulfatase kodiert (Murooka *et al.* 1978), und dem *hemCDXY*-Operon, welches für Proteine der Tetrapyrrol-Synthese kodiert ((GOA *et al.* 2001), siehe Abb. 4.2.) .



**Abb. 4.2.: Position des glmZ im E. coli-Genom**

Das Gen *glmZ* ist zwischen dem Gen für eine Arylsulfatase, *aslA*, und dem letzten Gen des *hemCDXY*-Operons lokalisiert.

Das korrespondierende Genprodukt ist die kleine, nichtcodierende RNA GlmZ, von welcher aus früheren Untersuchungen lediglich bekannt war, dass sie von Hfq (*host factor required for phage Q $\beta$  RNA replication*, oder auch Host factor 1) gebunden wird und dass auch eine stabile prozessierte Form in der Zelle vorliegt (Argaman *et al.* 2001; Rivas *et al.* 2001; Wassarman *et al.* 2001). Diese Prozessierung wurde als RNase III-abhängig beschrieben (Argaman *et al.* 2001).



**Abb. 4.3.: Transposon-Insertionen im Gen *glmZ* verhindern die Überexpression von *glmS* in einem *yhbJ*-Deletionsstamm**

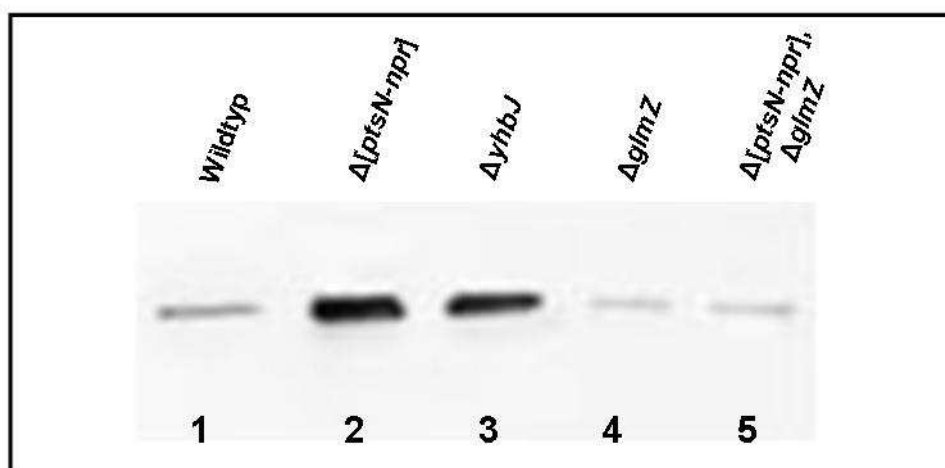
Transposonmutanten aus der Mutagenese unter Verwendung des  $\Delta yhbJ$ -Stamm mit chromosomaler *glmS-lacZ*-Reporterfusion (Z28) mit einer Insertionen des Transposons in oder nahe des Gens *glmZ* wurden, ebenso wie der Ausgangsstamm Z28, eine [*ptsN-npr1*]-Deletion (Z5) und der korrespondierende Wildtyp (Z8), in LB-Medium inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wie unter 3.3.4. beschrieben bestimmt.

Die Insertion des Transposon in oder nahe des Gens *glmZ* verhindert die erhöhte Reporteraktivität in Abwesenheit von *yhbJ*.

Die Positionen der Insertion sind relativ zur ersten Base des *glmZ*-Gens angegeben.

Die Mutanten, bei denen das Transposon in oder nahe *glmZ* integrierte, wiesen im  $\beta$ -Galaktosidase-Assay eine stark verringerte Aktivität der *glmS-lacZ*-Reporterfusion auf, obwohl das *yhbJ*-Gen deletiert ist. In den meisten Fällen war diese Aktivität auf einem ähnlichen Niveau wie die des Wildtyp-Stammes Z8 (vergleiche Abb. 4.3.).

Daraufhin wurde eine markerlose Deletion von *glmZ* sowohl im Wildtyp als auch im  $\Delta yhbJ$ -Hintergrund generiert (siehe 3.5.3.) und diese Stämme mittels Western Blot Analyse (siehe 3.7.7.) mit polyklonalen Anti-Körpern gegen GlmS untersucht. Hierbei wiesen Stämme mit einer Deletion von *yhbJ* deutlich höhere Mengen an GlmS als der Wildtyp auf (vergleiche Abb. 4.4. Spur 1 mit Spur 2 beziehungsweise 3). In einem  $\Delta glmZ$ - sowie einem  $\Delta glmZ \Delta [ptsN-npr]$ -Hintergrund war die GlmS-Menge jedoch geringer als im Wildtyp (vergleiche Abb. 4.4. Spur 4 und 5 mit Spur 1). Hieraus lässt sich schließen, dass *glmZ* für die Akkumulation von GlmS in Abwesenheit von YhbJ erforderlich ist und somit einen essentiellen Bestandteil des hier untersuchten Regulationsmechanismus zur Expression von *glmS* darstellt.



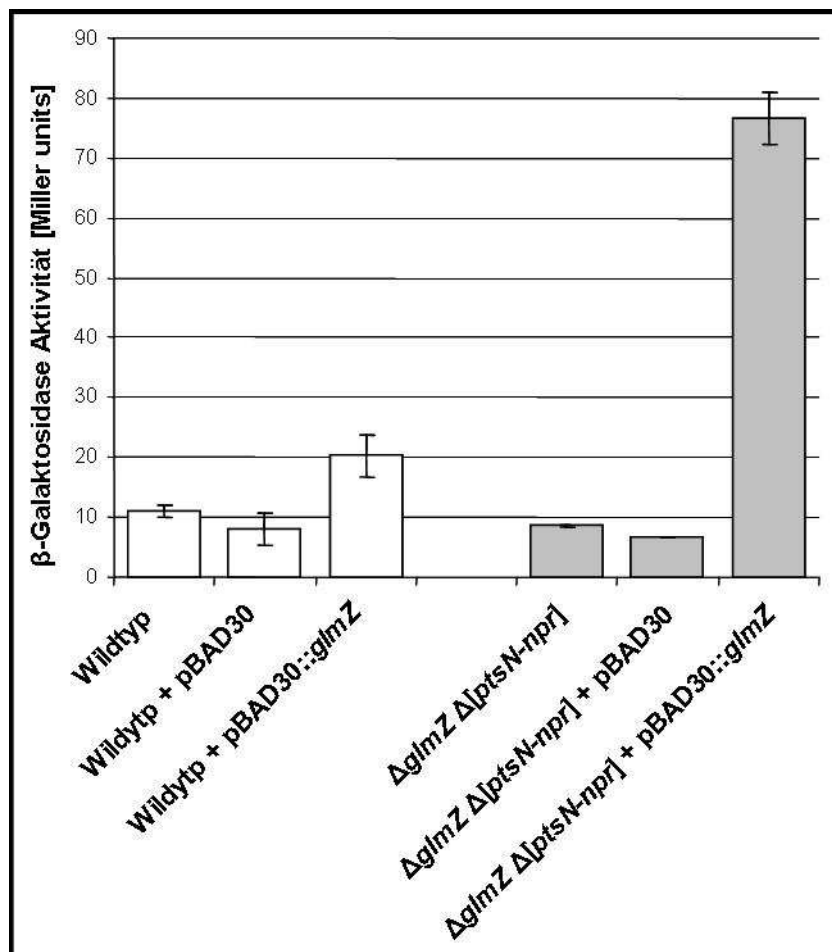
**Abb. 4.4.: Analyse der GlmS-Menge in Abhängigkeit von GlmZ.**

Der Wildtyp R1279 sowie die Stämme  $\Delta [ptsN-npr]$  (R2413),  $\Delta yhbJ$  (Z24),  $\Delta glmZ$  (Z44) und  $\Delta [ptsN-npr] \Delta glmZ$  (Z46) wurden in LB-Medium inkubiert bis eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte hergestellt (siehe 3.7.1.) und wie unter 3.7.7. beschrieben eine Western Blot Analyse unter Verwendung polyklonaler Antikörper gegen GlmS durchgeführt.

Es ist eine deutliche Erhöhung der GlmS-Menge in Abwesenheit von *yhbJ* erkennbar. Eine Deletion von *glmZ* verhindert die Überexpression von GlmS, sogar in Abwesenheit von *yhbJ*.

Dies wird bestätigt durch Komplementationsexperimente, in denen *glmZ* plasmidisch in den Wildtyp und eine  $\Delta glmZ \Delta [ptsN-npr]$ -Deletion eingebracht und überexprimiert wurde. Wie aus Abb. 4.5. ersichtlich ist in Abwesenheit von *glmZ* keine verstärkte Expression der *glmS-lacZ*-Reporterfusion erkennbar, selbst wenn *yhbJ* deletiert ist (vergleiche Abb. 4.5 Balken 1 und 4). Wird *glmZ* jedoch von einem Plasmid aus stark

exprimiert, zeigt sich in der  $\Delta glmZ \Delta[ptsN-npr]$ -Deletion eine vollständige Komplementation und Wiederherstellung der verstärkten *glmS*-Expression, was auch in einer erhöhten Aktivität der *glmS'-lacZ*-Reporterfusion resultiert (vergleiche Abb. 4.5. Balken 4 und 6). Erstaunlicherweise führt eine plasmidische Expression von *glmZ* im Wildtyp ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität der *glmS'-lacZ*-Reporterfusion (vergleiche Abb. 4.5. Balken 1 und 3). Daraus kann geschlossen werden, dass *glmZ* im Regulationsmechanismus stromabwärts von YhbJ agiert.



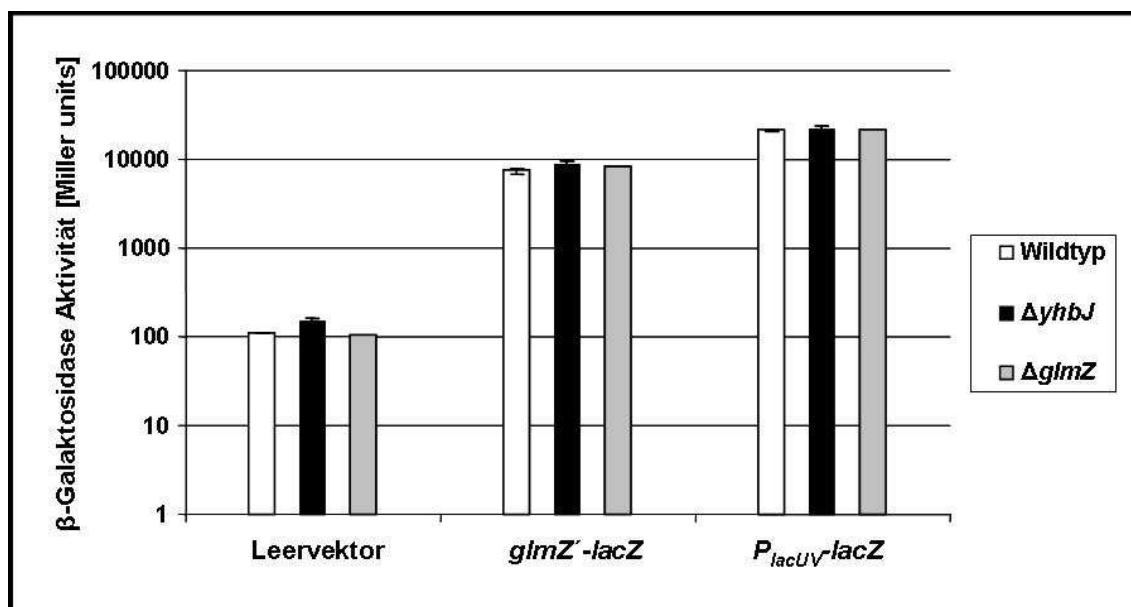
**Abbildung 4.5.: Ein  $\Delta glmZ$ -Stamm kann durch plasmidisch exprimiertes *glmZ* komplementiert werden.**

Ein *glmZ*-Deletionsstamm (Z40) und ein  $\Delta glmZ \Delta[ptsN-O]$ -Stamm (Z43) mit chromosomaler *glmS-lacZ*-Reporterfusion wurden mit einem Plasmid transformiert, welches *glmZ* unter Kontrolle des induzierbaren  $P_{Ara}$ -Promotors trägt (pBGG 84). Die Transformanten wurden unter Induktion mit 0,2% (w/v) L-Arabinose in LB-Medium (siehe 3.2.1.) bei 37°C auf einem Horizontalschüttler inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht wurde und die Aktivität der Reporterfusion wurde wie unter 3.3.4. beschrieben bestimmt.

Die Expression des plasmidständigen *glmZ* komplementiert die Deletion des chromosomalen *glmZ* vollständig und rekonstituiert die hohe Reporteraktivität im  $\Delta glmZ \Delta[ptsN-O]$ -Hintergrund. Zugleich induziert die *glmZ*-Expression vom Plasmid aus auch im Wildtyp eine leicht erhöhte Reporteraktivität in Anwesenheit von *yhbJ*.

4.1.3. Die Expression von *glmZ* ist nicht durch YhbJ beeinflusst oder autoreguliert

Um das Verhältnis von GlmZ und YhbJ weiter zu klären, wurde der Einfluß von YhbJ auf die Expression von *glmZ* sowie eine mögliche Autoregulation von GlmZ untersucht. Hierzu wurde eine plasmidständige *glmZ'*-*lacZ*-Reporterfusion generiert (pBGG59, siehe Tabelle 7.2.) und ihre Aktivität in entsprechenden Deletionsstämmen untersucht (siehe Abb. 4.6.).



**Abb. 4.6.: Untersuchung zur Expression von *glmZ***

Der Wildtyp R1279 sowie die Stämme  $\Delta yhbJ$  (Z37) und  $\Delta glmZ$  (Z45) wurden mit den Leervektor (pKEM04, Negativkontrolle), einem  $P_{lacUV}$ -*lacZ*-tragenden Plasmid (pKEM99, Positivkontrolle) und einem Plasmid mit der *glmZ'*-*lacZ*-Reporterfusion (pBGG59) transformiert und in LB-Medium inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt (siehe 3.3.4.).

Es ist keinerlei Effekt einer Deletion von *yhbJ* oder *glmZ* selbst auf die Aktivität der *glmZ'*-*lacZ*-Reporterfusion messbar.

Vergleicht man die Werte der *glmZ'*-*lacZ*-Aktivität in Wildtyp mit dem  $\Delta yhbJ$ - und  $\Delta glmZ$ -Hintergrund, so zeigt sich keinerlei Effekt der Deletionen auf die Expression der *glmZ'*-*lacZ*-Reporterfusion.

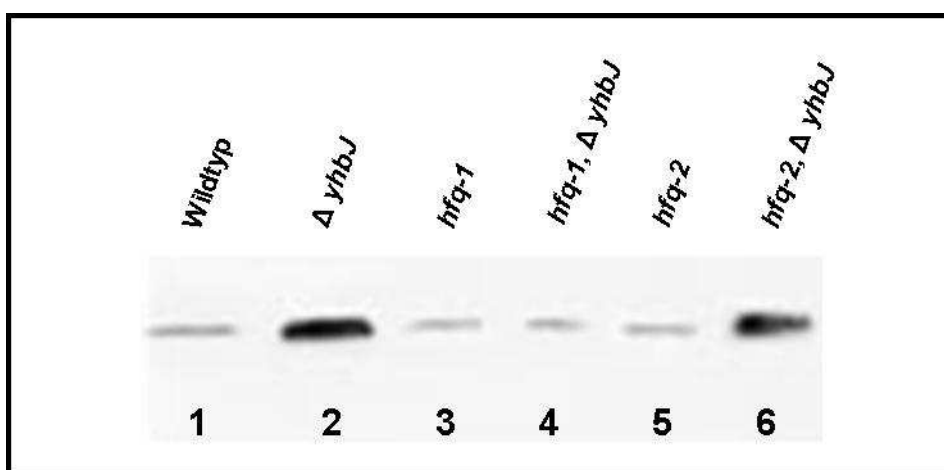
Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Wirkung von YhbJ auf die Regulation der GlmS-Expression auf einer Beeinflussung der Expression von *glmZ* beruht.

Ebenso kann eine Autoregulation der Expression durch GlmZ ausgeschlossen werden.

#### 4.1.4 Die Rolle von Hfq in der Regulation der *glmS*-Expression

Für die kleine, nicht-kodierende RNA GlmZ ist beschrieben, dass sie mit dem Protein Hfq interagieren kann (Wassarman *et al.* 2001). Hfq bindet bevorzugt an U/A-reiche, einzelsträngige RNA-Sequenzen in der Nähe von Haarnadelstrukturen. Zudem ist es ein wichtiger Faktor in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression: Es bindet sRNAs und stabilisiert deren Interaktion mit ihren Ziel-mRNAs (Brennan und Link 2007). Somit stellte sich die Frage, ob Hfq einen Einfluss auf die Regulation der *glmS*-Expression durch GlmZ hat.

Hierzu wurden Western Blot-Analysen (siehe 2.7.7.) mit Antikörpern gegen GlmS durchgeführt, in denen ein *hfq*-defekter Stamm (*hfq-1*) (Tsui *et al.* 1994) in An- und Abwesenheit von *yhbJ* untersucht wurden (siehe Abb. 4.7.) In diesen Stämmen ist das Gen für Hfq durch Insertion einer Resistenzkassette inaktiviert. Da *hfq* das erste Gen im *hfq-hfLYCK*-Operon ist (GOA *et al.* 2001), könnte diese Insertion zu polaren Effekten auf die stromabwärts gelegenen Gene führen. Deshalb wurden parallel Stämme mit dem *hfq-2*-Allel verwendet, in dem die Resistenzkassette am 3'-Ende des *hfq*-Gens inseriert ist. Dadurch kann ein funktionales Hfq-Protein hergestellt werden, jedoch wirken dieselben möglichen polaren Effekte auf die stromabwärts gelegenen Gene wie im *hfq-1*-Allel. So kann überprüft werden, ob die beobachteten Effekte ausschließlich auf der Inaktivierung von *hfq* beruhen.



**Abb. 4.7.: Analyse der GlmS-Menge in Abhängigkeit von Hfq.**

Der Wildtyp R1279 und die Stämme  $\Delta yhbJ$  (Z24), *hfq-1* (Z60),  $\Delta yhbJ$  *hfq-1* (Z61), *hfq-2* (Z62) und  $\Delta yhbJ$  *hfq-2* (Z63) wurden in LB-Medium inkubiert bis eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte hergestellt (siehe 3.7.1.) und wie unter 3.7.7. beschrieben eine Western Blot Analyse unter Verwendung polyklonaler Antikörper gegen GlmS durchgeführt.

Während sich die Kontrollstämme mit *hfq-2*-Allel wie der Wildtyp verhalten und in Abwesenheit von *yhbJ* eine deutlich erhöhte GlmS-Menge aufweist, ist in den Stämmen mit dem inaktiven *hfq-1*-Allel selbst in Abwesenheit von *yhbJ* keine erhöhte GlmS-Expression zu beobachten.



In Abb. 4.7. ist im Vergleich von Spur 1 und 2 die Akkumulation von GlmS in Abwesenheit von YhbJ erkennbar. Die Kontrollstämme *hfq-2* und *hfq-2*  $\Delta$ *yhbJ* zeigen dasselbe Verhalten wie der Wildtyp und ein  $\Delta$ *yhbJ*-Stamm (vergleiche Abb. 4.7. Spur 1 und 2 mit Spur 5 und 6). Im Stamm *hfq-1*, in dem *hfq* durch Insertion der Resistenzkassette inaktiviert wurde, ist die intrazelluläre Menge von GlmS mit der des Wildtyps vergleichbar (vergleiche Spur 1 und 3). Eine Deletion von *yhbJ* im *hfq-2*-Stamm zeigt jedoch keine Erhöhung der GlmS-Menge in der Zelle, die Stärke des detektierbaren Signals entspricht ebenfalls der des Wildtyps.

Dies zeigt, dass funktionales Hfq für die verstärkte *glmS*-Expression in *E. coli* erforderlich ist. Ein wahrscheinlicher Mechanismus an dieser Stelle ist die Stabilisierung der sRNA/mRNA-Interaktion durch Hfq.

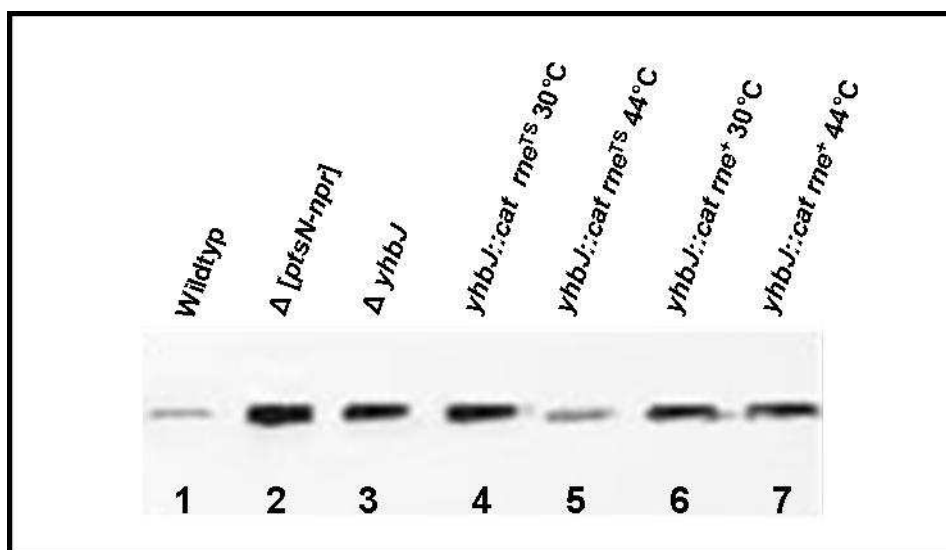
### 4.1.5. Die Rolle von RNase E in der Regulation der *glmS*-Expression

Vorherige Analysen des *glmS*-spezifischen Transkriptes durch Primer-Extension zeigten, dass der Startpunkt des Transkriptes mit dem Stopcodon von *glmU* übereinstimmt (siehe 1.3.5.). Zudem wurde beschrieben, dass in einer Deletion des Genes *pcnB*, welches für die Poly(A)-Polymerase PAP I kodiert, ebenfalls ein *glmS*-spezifisches Transkript akkumuliert, welches durch die Prozessierung des ursprünglichen *glmUS*-Transkriptes am 3'-Ende von *glmU* durch RNase E entsteht (Joanny *et al.* 2007).

Um nun zu untersuchen, ob die hier beobachtete spezifische Prozessierung des primären *glmUS*-Transkriptes sowie die daraus resultierende Erhöhung der GlmS-Menge in der Zelle in Abwesenheit von YhbJ ebenfalls von RNase E abhängig ist, wurden Western Blot-Analysen (siehe 3.7.7.) mit Antikörpern gegen GlmS durchgeführt (siehe Abbildung 4.8). Da RNase E in *E. coli* ein essentielles Gen darstellt (Gerdes *et al.* 2003), wurde auf einen Stamm mit dem temperatursensitiven *rne3071(ts)*-Allel und dem Kontroll-Allel *rne*<sup>+</sup> (Goldblum und Apririon 1981) zurückgegriffen. Das Allel *rne3071(ts)* kodiert für eine Variante der RNase E, die durch eine Erhöhung der Temperatur auf der Protein-Ebene inaktiviert wird. Im Gegensatz zur temperatursensitiven Kontrolle der Transkription, bei der die Zellen nach der Erhöhung langsam an dem entsprechenden Genprodukt verarmen, handelt es sich hierbei um ein sofortiges und vollständiges Ausschalten der RNase E-Aktivität.

Die Stämme wurden bei 30°C in LB-Medium (siehe 2.2.1.) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3 erreicht wurde. Daraufhin wurden die Kulturen geteilt: Eine Hälfte wurde

weiterhin bei 30°C inkubiert, was eine fortlaufende Aktivität der temperatursensitiven RNase E erlaubte, während die andere Hälfte bei der in dieser Hinsicht restriktiven Temperatur von 44°C inkubiert wurde.



**Abb 4.8: Analyse der *glmS*-Expression in Abhängigkeit von Rnase E**

Der Wildtyp (R1279) sowie die Stämme  $\Delta[ptsN-npr]$  (R2413),  $\Delta yhbJ$  (Z24),  $rne^{TS} yhbJ::cat$  (Z52) und  $rne^{+} yhbJ::cat$  (Z53) wurden wie unter 4.1.5. beschrieben in LB-Medium inkubiert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte hergestellt (siehe 3.7.1.) und wie unter 3.7.7. beschrieben eine Western Blot Analyse unter Verwendung polyklonaler Antikörper gegen GlmS durchgeführt.

Während sich die Kontrollstämme mit  $rne^{+}$ -Allel wie der Wildtyp verhalten und in Abwesenheit von *yhbJ* eine deutlich erhöhte GlmS-Menge aufweist, ist in den Stämmen mit dem temperatursensitiven  $rne^{TS}$ -Allel bei restriktiver Temperatur eine deutlich geringere GlmS-Expression zu beobachten.

Wie in Abb. 4.8. Spur 1 bis 3 zu sehen, weisen auch hier der  $\Delta yhbJ$ - beziehungsweise  $\Delta[ptsN-O]$ -Deletionsstamm eine deutlich höhere GlmS-Menge auf als der Wildtyp. Der Kontrollstamm mit einer *yhbJ*-Deletion und dem  $rne^{+}$ -Allel verhält sich wie eine *yhbJ*-Deletion im Wildtyp mit dem nativem *rne*-Allel, und zwar sowohl bei 30°C wie auch bei 44°C (vergleiche Spur 2 mit 6 und 7).

Ein Stamm mit dem  $rne^{3071(ts)}$ -Allel im  $\Delta yhbJ$ -Hintergrund verhält sich bei der nicht-restriktiven Temperatur von 30°C ebenfalls wie eine *yhbJ*-Deletion mit dem nativem *rne*-Allel. Nach einer Erhöhung der Temperatur auf 44°C hingegen, wenn eine weitere Aktivität von RNase E verhindert wird, zeigt sich eine deutliche Abnahme der GlmS-Menge im Vergleich zur Inkubation bei 30°C (vergleiche Spur 4 und 5) sowie auch im Vergleich zur *yhbJ*-Deletion mit nativer RNase E oder dem  $rne^{+}$ -Allel (vergleiche Spur 5 mit 2 respektive 6 und 7). Zudem kann unter diesen Umständen ein weiteres Signal in einer Northern Blot Analyse mit einer Sonde gegen *glmS* detektiert werden, dessen Größe mit dem *glmUS*-Primärtranskript korrespondiert (Kalamorz *et al.* 2007).

Demnach ist die erhöhte GlmS-Menge in einem  $\Delta yhbJ$ -Hintergrund zurückzuführen auf die Akkumulation eines *glmS*-spezifischen Transkriptes, welches durch die Prozessierung der primären *glmUS*-mRNA durch RNase E generiert wird.

## 4.2. Identifikation des Signals

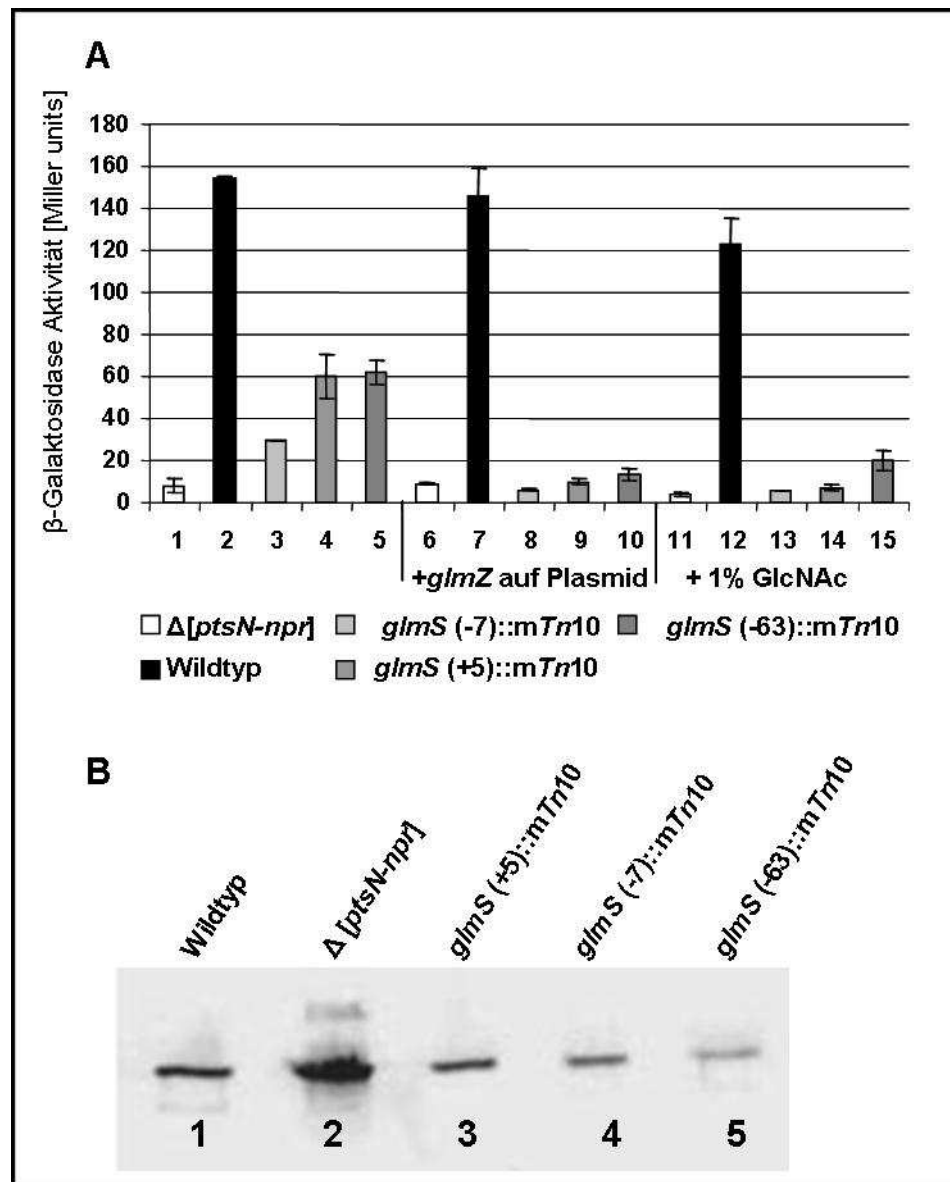
Bislang konnte gezeigt werden, dass die Expression von *glmS* durch einen Prozess reguliert wird, an dem neben Hfq und RNase E vor allem die sRNA GlmZ und das Protein YhbJ beteiligt sind. Die stark erhöhte GlmS-Expression konnte aber bis zu diesem Punkt exklusiv in der artifiziellen Situation der vollständigen Abwesenheit eines funktionalen *yhbJ*-Gens gezeigt werden. Es stellt sich somit die Frage, welche natürlich vorkommenden Bedingungen zu einer Aktivierung dieses Regulationsmechanismus führen und welches Signal zu diesem Zweck detektiert wird.

### 4.2.1. Die Inaktivierung von GlmS führt zu einer verstärkten Aktivität der *glmS-lacZ*-Reporterfusion

Wie bereits unter 4.1.1. beschrieben resultierte die Transposonmutagenese im Wildtyp-Stamm Z8 unter Anderem in drei Mutanten, die Insertionen in oder nahe des *glmS*-Gens trugen. Eine Messung der Aktivität der *glmS-lacZ*-Reporterfusion in diesen Stämmen ergab eine erhöhte Aktivität, die etwa 20-45% der Aktivität einer *yhbJ*-Deletion ausmachte (vergleiche Abb. 4.9.A Balken 1 und 2 mit Balken 3 bis 5).

Die anschließende Analyse der in der Zelle vorhandenen Menge an GlmS mittels Western Blot Analyse (siehe 3.7.7.) zeigte, dass die Transposonmutanten in der Lage sind, GlmS zu synthetisieren, jedoch in deutlich geringeren Mengen als der Wildtyp (vergleiche Abb. 4.9.B Spur 1 mit 3, 4 und 5).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgern, dass die Insertion der Transposons nahe dem Startpunkt von *glmS* die Menge an Protein in der Zelle herabsetzt, was im Gegenzug eine Aktivierung der Expression der *glmS-lacZ*-Reporterfusion nach sich zieht.



**Abb. 4.9.: Eine Reduktion der GlmS-Synthese erhöht die Aktivität der *glmS-lacZ*-Reporterfusion.**

(A) Der Wildtyp mit chromosomaler *glmS-lacZ*-Reporterfusion (Z8), ein korrespondierender  $\Delta[ptsN-npr]$ -Stamm (Z5) sowie die drei Transposonmutanten mit Insertionen in oder nahe *glmS* (Z8 TM1, Z8 TM2 und Z8 TM3, siehe Tab.4.1.) wurden in LB-Medium bei 37°C auf einem Horizontalschüttler inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht wurde. Ausserdem wurden die Stämme mit einem Plasmid transformiert, welches *glmZ* unter Kontrolle des induzierbaren  $P_{tac}$ -Promotors trägt und wie beschrieben in LB-Medium mit 1mM IPTG inkubiert.

Zusätzlich wurden die genannten Stämme in LB-Medium mit 1% (w/v) GlcNAc inkubiert.

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *glmS-lacZ*-Reporterfusionen unter diesen Bedingungen wurde wie unter 3.3.4. beschrieben bestimmt.

Die erhöhte Aktivität der Reporterfusion in den Transposonmutanten kann sowohl durch *glmZ*-Expression von einem Plasmid aus als auch durch die Zugabe von GlcNAc aufgehoben werden.

(B) Western Blot Analyse (siehe 2.7.7.) unter Verwendung polyklonaler Antikörper gegen GlmS. Es wurden Rohzelleextrakte der oben genannten Stämme und Mutanten verwendet, die unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurden. Eine  $[ptsN-npr]$ -Deletion führt zu einer stark erhöhten GlmS-Menge in der Zelle. Im Gegensatz hierzu ist die Proteinkonzentration in den Transposonmutanten geringer als im Wildtyp. Die Insertionen reduzieren demnach die Expression des chromosomal kodierten *glmS*, machen sie aber nicht unmöglich.

Um zu prüfen, ob die verringerte Menge an GlmS in der Zelle die Ursache für die Erhöhung der Reporteraktivität ist, wurden die Transposonmutanten mit plasmidisch kodierten *glmS* (pBGG56, siehe Tabelle 7.2.) komplementiert. Dies resultierte in einer deutlichen Absenkung der Reporteraktivität auf Werte nahe denen des Wildtyps (vergleiche Abb. 4.9.A Balken 8-10 mit Balken 3-5 sowie mit Balken 7).

Dies lässt zwei Alternativen zu: Entweder ist die direkte Präsenz einer bestimmten Menge GlmS in der Zelle erforderlich, um die eigene Expression zu reprimieren (beispielsweise durch direkte Interaktion mit einem anderen an der Regulation beteiligten Faktor), oder die enzymatische Aktivität (und somit in Konsequenz die Menge an Glukosamin-6-Phosphat oder eines Metabolites stromabwärts davon) ist ausschlaggebend für die Stärke der Expression. Um dies zu prüfen wurden die Transposonmutanten in Medium inkubiert, welchem 1% (w/v) GlcNAc zugesetzt wurde. Dieses kann über NagE und den ManXYZ-Transporter in die Zelle aufgenommen und auf der Ebene von GlcN-6-P in den Syntheseweg der Zellwand-Vorläufer eingespeist werden (Alvarez-Anorve et al. 2005), wodurch die Aktivität von GlmS überflüssig wird (siehe 2.3.1.).

Unter diesen Bedingungen zeigten die Transposonmutanten eine vollständige Reprimierung der Reporteraktivität auf das Niveau des Wildtyps (vergleiche Abb. 4.8.A Balken 13-15 mit Balken 3-5 beziehungsweise mit 2 und 12).

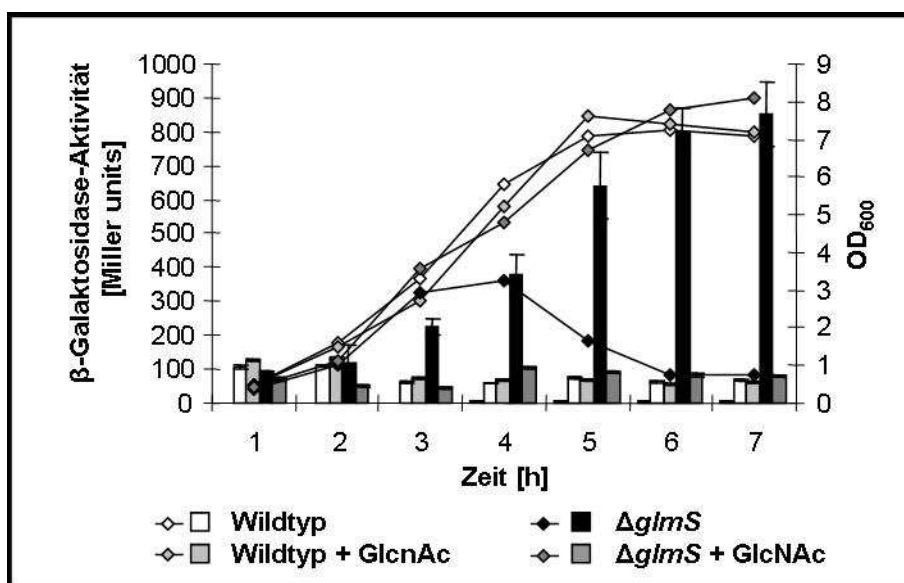
Um die Abhängigkeit der erhöhten Aktivität der *glmS-lacZ*-Reporterfusion von einer verringerten enzymatischen GlmS-Aktivität zu bestätigen, wurden ein  $\Delta glmS$ -Stamm (IBPC750) und sowie der korrespondierende Wildtyp IBPC5321 ((Plumbridge und Vimr 1999), siehe Tabelle 7.1.) verwendet. Unter den meisten Bedingungen ist die Aktivität von GlmS essentiell für die Zelle, und eine Mutation von *glmS* wirkt letal. Da *E. coli* jedoch in der Lage ist, Aminozucker aus dem Medium aufzunehmen und zu verwerten (siehe 2.3.), kann eine Zugabe von 1% (w/v) GlcNAc die Letalität einer *glmS*-Deletion aufheben.

Die beiden Stämme wurden mit einer plasmidständigen Version der *glmS-lacZ*-Reporterfusion (pBGG16, siehe Tabelle 7.2.) transformiert (siehe 3.3.3.) und in LB-Medium mit 1% GlcNAc inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3 erreicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt ( $t_0$ ) wurden die Kulturen aufgeteilt, für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 5000 rpm zentrifugiert und die Pellets in ZAP gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wie zuvor wurden die Pellets entweder in LB-Medium oder in LB-Medium mit 1% Glukosamin gelöst und die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die so geteilten Kulturen

wurden weiter bei 37° C auf dem Horizontalschüttler inkubiert und stündlich die OD<sub>600</sub> bestimmt sowie Proben für β-Galaktosidase Assays entnommen (siehe 3.3.4.). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.10. dargestellt.

Der  $\Delta glmS$ -Stamm zeigt beim Wachstum in LB-Medium mit 1% GlcNAc keinerlei Beeinträchtigung gegenüber dem Wildtyp. In Medium ohne eine externe Aminosuckerquelle hingegen verlangsamt sich das Wachstum nach 2 h deutlich (siehe Abb. 4.10. Zeitpunkt 2), und nach 3 h kommt es zu einer Verringerung der OD<sub>600</sub> durch Absterben der Bakterien (siehe Abb. 4.10. Zeitpunkt 3). Parallel zur Abnahme der OD<sub>600</sub> ist eine starke Expression der *glmS-lacZ*-Reporterfusion zu beobachten, die schließlich einen neunfach höheren Wert im Vergleich zum Wildtyp oder der *glmS*-Deletion in LB mit 1% GlcNAc erreicht (siehe Abb. 4.10. Zeitpunkt 6).

Zusammenfassend zeigt dies, dass die verringerte enzymatische Aktivität von GlmS und die dadurch verursachte Verarmung an Metaboliten der Zellwand-Vorläufer eine erhöhte Aktivität der *glmS-lacZ*-Reporterfusion bedingt.



**Abb. 4.10.: Verarmung von GlmS führt zu verstärkter Aktivität der *glmS'*-*lacZ*-Reporterfusion**

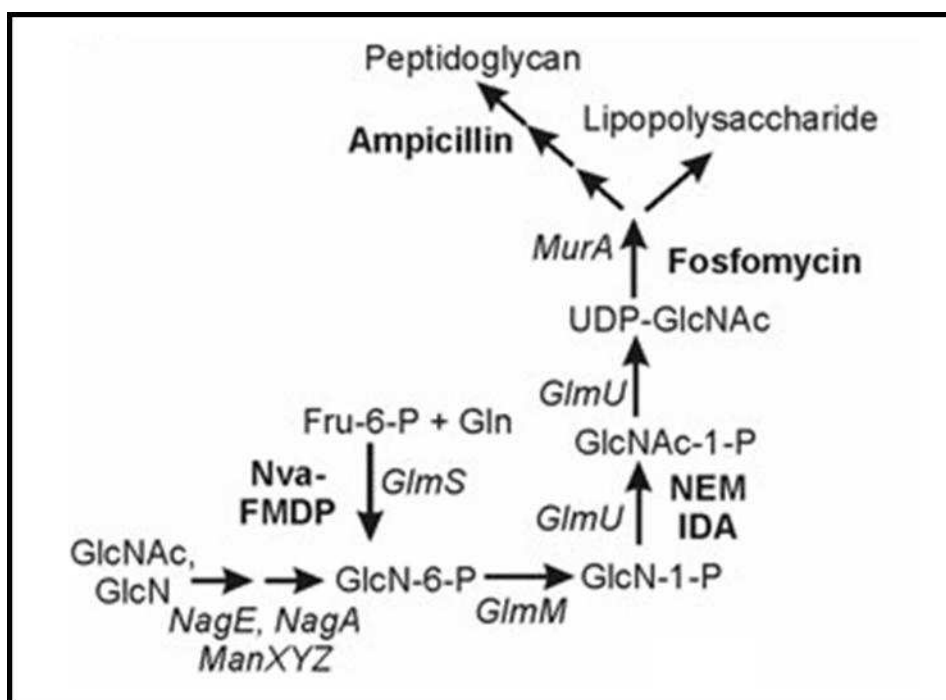
Ein  $\Delta glmS$ -Stamm (IBPC750) und der korrespondierende Wildtyp (IBPC5321) wurden mit dem Plasmid pBGG16 transformiert, welches eine *glmS'*-*lacZ*-Reporterfusion trägt. Die Transformanten wurden in LB-Medium mit 1% (w/v) GlcNAc inkubiert, bis sie eine OD<sub>600</sub> von 0,3 erreichten. Die Kulturen wurden geteilt und in An- und Abwesenheit von GlcNAc inkubiert. Nach diesem Zeitpunkt  $t_0$  wurde stündlich die optische Dichte bestimmt sowie Proben für die Messung der β-Galaktosidase-Aktivität (siehe 3.3.4.) genommen.

Während der Wildtyp und die Mutante in Medium mit GlcNAc weder eine erhöhte Reporteraktivität noch einen Wachstumsdefekt aufweisen, kommt es im  $\Delta glmS$ -Stamm bei Entzug der externen Aminosuckerquelle zu einem starken Anstieg der Aktivität der *glmS'*-*lacZ*-Reporterfusion und nach 3 h zu einer Abnahme der Zelldichte.

Weder die plasmidische Expression von *GlmS* noch der Zusatz von GlcNAc zum Medium hat einen Einfluß auf die Aktivität der *glmS-lacZ*-Reporterfusion in Abwesenheit von *yhbJ* (vergleiche Abb. 4.9.A Balken 1, 6 und 11), was darauf hinweist, dass *YhbJ* stromabwärts des Signal-detektierenden Faktors wirkt.

#### 4.2.2. Identifikation des Signal-Metabolits

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Verarmung eines Metaboliten im Sytheseweg der Zellwand-Vorläufer zu einer erhöhten *glmS*-Expression führt, musste nun die entsprechende Verbindung identifiziert werden.



**Abb. 4.11.: Anaboler Aminosuckermetabolismus in *E. coli***

GlcN-6-P kann entweder durch Aufnahme externer Aminosucker oder die *de novo*-Synthese über *GlmS* generiert werden. Es wird durch *GlmM* und *GlmU* zu UDP-GlcNAc umgesetzt, welches der zentrale Vorläufer für den Aufbau von Peptidoglykan und Lipopolysacchariden ist.

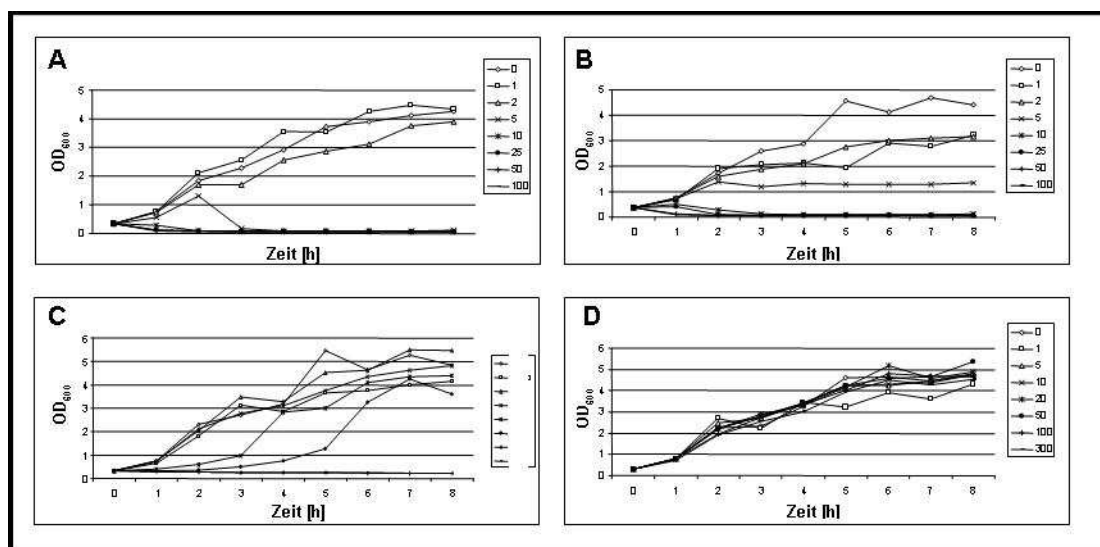
Die Enzyme, die die dargestellten Schritte katalysieren, sind kursiv gedruckt, Inhibitoren bestimmter Schritte fett.

GlcN= Glukosamin, GlcNAc= N-Acetylglukosamin, GlcN-6-P= Glukosamin-6-Phosphat, GlcN-1-P= Glukosamin-1-Phosphat, GlcNAc-1-P= N-Acetylglukosamin-1-Phosphat, UDP-GlcNAc= Uridin-5'-diphospho-N-Acetylglukosamin.

Hierzu wurden Inhibitoren verschiedener enzymatischer Schritte des Syntheseweges von Peptidoglykan eingesetzt (siehe Abb. 4.11). *Nva-FMDP* ist ein Derivat der N3-(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanol-Säure (FMDP) und stellt einen spezifischen Inhibitor der Glukosamin-6-Phosphat Synthase *GlmS* und somit des initialen Schrittes

der *de novo*-Synthese von Zellwand-Vorläufern dar (Marshall *et al.* 2003). Iodacetamid (IDA) und N-Ethylmaleimid (NEM) wirken auf die N-Acetyl-glukosamin-1-Phosphat Uridyltransferase / Glukosamin-1-Posphat Acetyltransferase GlmU und verhindert die Umwandlung von Glukosamin-1-Phosphat zu N-Acetyl-Glukosamin-1-Phosphat und weiter zu UDP-GlcNAc, welches einen der letzten gemeinsamen Vorläufer von Peptidoglycan und Lipopolysacchariden darstellt (Burton *et al.* 2006). Direkt stromabwärts von UDP-GlcNAc wirkt Fosfomycin durch Inhibition der UDP-GlcNAc-enol-Pyruvattransferase MurA (Kahan *et al.* 1974). Das Enzym eines der letzten Schritte der Peptidoglycan-Synthese, die Transpeptidase, wird durch das  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum Ampicillin inhibiert (Nguyen-Disteche *et al.* 1974).

Zunächst mussten subinhibitorische Konzentrationen dieser Stoffe ermittelt werden. Hierzu wurden Wachstumskurven des Wildtyps mit chromosomaler *glmUS-lacZ*-Reporterfusion (Z9) aufgenommen. Der Stamm wurde mit aufsteigenden Konzentrationen der Wirkstoffe inkubiert (siehe Abb. 4.12.).



**Abb. 4.12.: Wachstumskurven zur Bestimmung subinhibitorischer Konzentrationen von Inhibitoren des anabolen Aminosuckermetabolismus in *E. coli***

Der Wildtypstamm mit chromosomaler *glmUS-lacZ*-Reporterfusion (Z9) wurde in LB-Medium inkubiert, bis er eine  $OD_{600}$  von 0,3 erreichte. Die Kultur wurde daraufhin aufgeteilt und mit aufsteigenden Konzentrationen der Wirkstoffe versetzt. Die Inkubation wurde fortgesetzt und stündlich die optische Dichte der Kultur bestimmt.

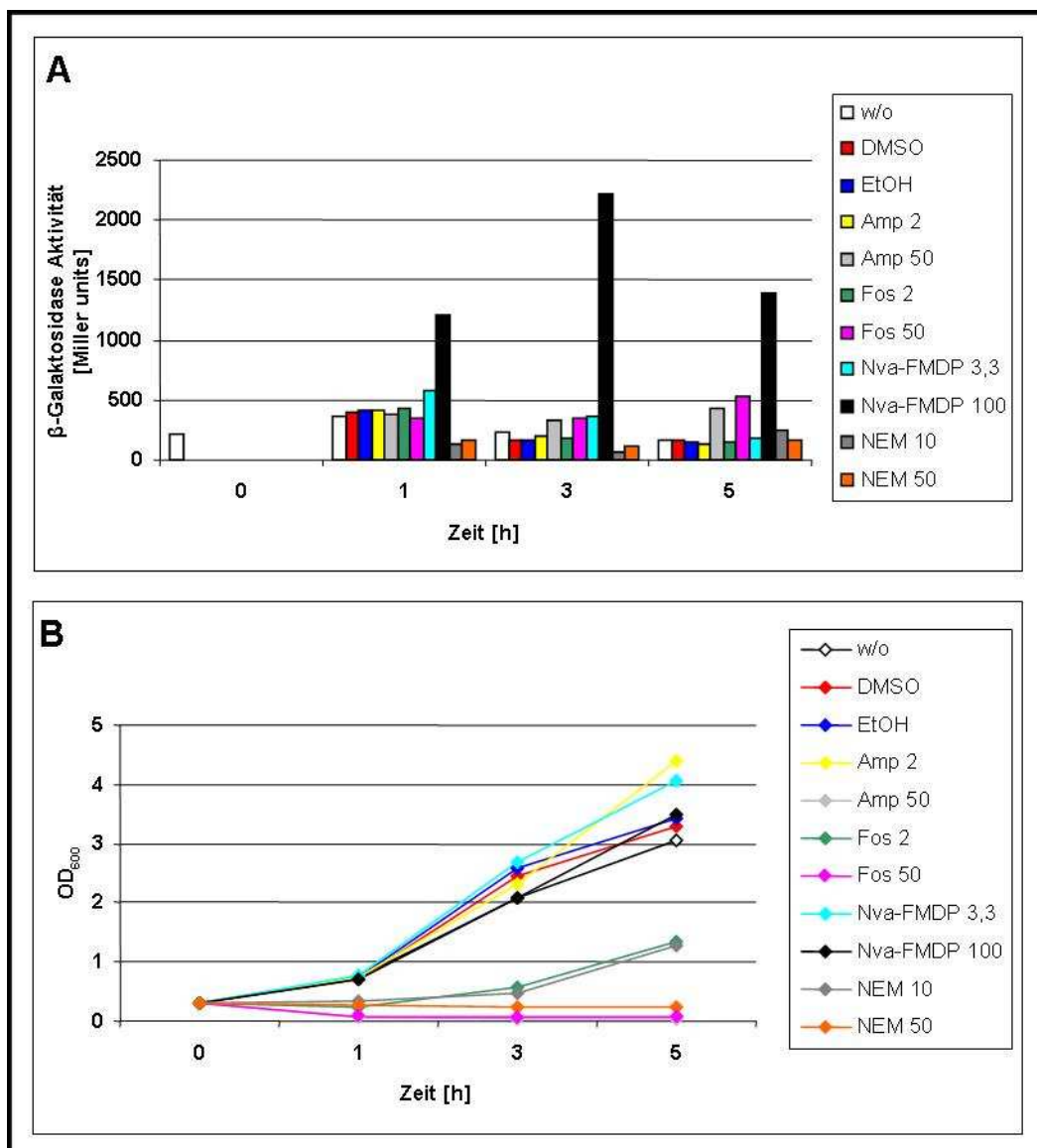
(A) Fosfomycin, (B) Ampicillin, (C) N-Ethylmaleimid, (D) Nva-FMDP.

Die so ermittelten subinhibitorischen Konzentrationen, die zwar das Wachstum des Stammes deutlich beeinträchtigen, jedoch nicht letal wirken, sind: Fosfomycin 2  $\mu$ g/ml (siehe 4.12.A), Ampicillin 2  $\mu$ g/ml (siehe 4.12.B), N-Ethylmaleimid 10  $\mu$ g/ml (siehe 4.12.C). Für Nva-FMDP konnte kein inhibitorischer Effekt auf das Wachstum des *E.*



*coli*-Stammes Z9 festgestellt werden, selbst für eine Konzentrationen von 300 µg/ml (siehe 4.12.D). Übereinstimmende Wachstumskurven wurden auch für den Wildtypstamm Z8 aufgenommen, welcher eine *glmS-5'-lacZ*-Reporterfusion trägt (Daten nicht gezeigt). Zur Untersuchung der Wirkung dieser Inhibitoren sollte nun die Aktivität der *glmUS-lacZ*-Reporterfusion in Anwesenheit dieser Stoffe untersucht werden. Der Stamm Z9 wurde in LB-Medium bei 37°C auf einem Horizontalschüttler inkubiert, bis die Kulturen eine OD<sub>600</sub> von 0,3 erreichten. Daraufhin wurden die Kulturen aufgeteilt und sowohl den ermittelten subinhibitorischen wie auch inhibitorischen Konzentrationen der genannten Wirkstoffe ausgesetzt. Zusätzlich wurden äquivalente Mengen DMSO und EtOH verwendet, da diese Stoffe als Lösungsmittel für einen Teil der Antibiotika dienten und ein Effekt dieser Verbindungen ausgeschlossen werden sollte. Es erfolgte eine Inkubation für weitere 5 h bei 37°C auf dem Horizontalschüttler. Stündlich wurde die OD<sub>600</sub> der Kulturen überprüft. Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt der Aufteilung (t<sub>0</sub>) sowie 1 h (t<sub>1</sub>), 3 h (t<sub>3</sub>) und 5 h (t<sub>5</sub>) nach der Aufteilung Proben für β-Galaktosidase-Aktivitätsmessungen entnommen (siehe 3.3.4.). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.12. dargestellt.

Zunächst ist zu beobachten, dass die als subinhibitorisch bestimmten Konzentrationen von Fosfomycin und NEM bereits ein deutlich verringertes Wachstum gegenüber der unbehandelten Kultur oder den subinhibitorischen Konzentrationen der anderen Wirkstoffe verursachen (siehe Abb. 4.13.B.). Da die Kulturen jedoch weiterhin Wachstum zeigten und eine niedrigere OD<sub>600</sub> in der Auswertung der β-Galaktosidase-Aktivitätsmessung normalisiert wird, ist dieser Effekt für das Experiment vernachlässigbar.



**Abb. 4.13.: Effekt der Inhibition von Schritten des anabolen Aminosuckermetabolismus auf die Aktivität der *glmUS-lacZ*-Reporterfusion**

Der Wildtyp mit chromosomaler *glmUS-lacZ*-Reporterfusion (Z9) wurde in LB-Medium inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3 erreicht wurde. Die Kultur wurde aufgeteilt und in Anwesenheit inhibitorischer und subinhibitorischer Konzentrationen der Wirkstoffe weiter inkubiert. Die optische Dichte wurde stündlich bestimmt. 1h, 3h und 5h nach Zugabe der Wirkstoffe wurden zudem Proben zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität genommen.

(A) Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase Assays. Lediglich die Zugabe hoher Konzentrationen Nva-FMDP hat einen Effekt auf die Reporterfusion und führt zu einer stark erhöhten Aktivität.

(B) Wachstumskurven der Kulturen. Während NEM und Fosfomycin selbst in geringer Konzentration einen negativen Effekt auf die Wachstumsrate der Kultur haben, ist das Wachstum in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Nva-FMDP nicht von dem einer unbehandelten Kultur zu unterscheiden.

w/o= ohne Zugabe, DMSO= 20% DMSO, EtOH= 70% Ethanol, Amp= Ampicillin, Fos= Fosfomycin, NEM= N-Ethylmaleimid.

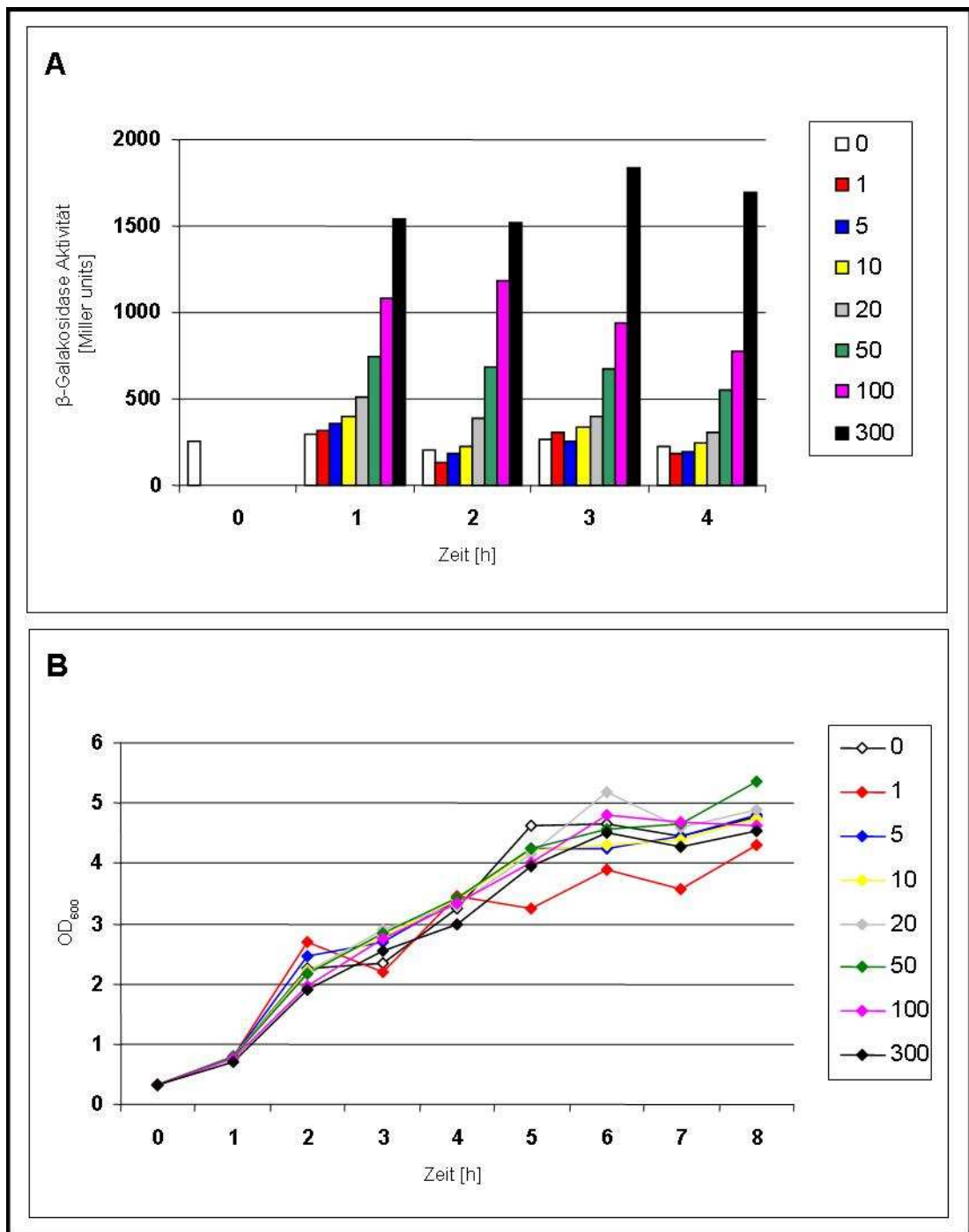
Auf der anderen Seite ist anzumerken, dass selbst eine Nva-FMDP-Konzentration von 100 µg/ml, was deutlich über der beobachteten MIC (*Minimal inhibitory concentration*, minimale inhibitorische Konzentration) für *Candida albicans* von 0,2 µg/ml liegt (Milewski *et al.* 1991), keinen Effekt auf das Wachstum des Stammes Z9 hat (vergleiche Abb. 4.13.B.).

Weiterhin ist zu beobachten, dass die Antibiotika Fosfomycin und Ampicillin, welche Schritte stromabwärts der Generierung von UDP-GlcNAc (und somit auch stromabwärts der enzymatischen Aktivität von GlmU) inhibieren, weder in subinhibitorischer noch in inhibitorischer Konzentrationen einen Effekt auf die Expression der Reporterfusion haben. Dasselbe Ergebnis zeigt die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der mit NEM induzierten Kultur (vergleiche Abb. 4.13.A).

Im Gegensatz dazu hat eine Behandlung der Kultur mit hohen Konzentrationen an Nva-FMDP einen starken Effekt auf die Expression der Reporterfusion und führt zu einer um einen Faktor 10 erhöhten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (2200 Miller units gegenüber 237 Miller units in der unbehandelten Kultur zum Zeitpunkt  $t_3$ , siehe Abb. 4.13.A.).

Um den Effekt von Nva-FMDP auf die Expression der *glmUS-lacZ*-Reporterfusion weiter zu charakterisieren, wurden Kulturen des Wildtyps Z9 mit aufsteigenden Konzentrationen dieses Stoffes inkubiert (siehe Abbildung 4.14.).

Wiederum zeigt keine der eingesetzten Konzentrationen von Nva-FMDP einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von Z9, jedoch ist bei der Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (siehe 3.3.4.) ein klarer Dosis-abhängiger Effekt erkennbar.



**Abb. 4.14.: Dosisabhängiger Effekt von Nva-FMDP auf die Aktivität der *glmUS-lacZ*-Reporterfusion**

Der Wildtyp mit chromosomaler *glmUS-lacZ*-Reporterfusion (Z9) wurde in LB-Medium inkubiert bis er eine OD<sub>600</sub> von 0,3 erreichte. Die Kultur wurde aufgeteilt und in Anwesenheit aufsteigender Konzentrationen von Nva-FMDP (von 0 mg/ml bis 300 mg/ml) weiter inkubiert. Stündlich wurde die optische Dichte bestimmt und Proben zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (siehe 3.3.4.) genommen.

(A) Ergebnisse des  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität Assays. Zugabe von Nva-FMDP führt zu einer deutlichen und dosisabhängigen Induktion der Reporter-Aktivität.

(B) Wachstumskurven der Kulturen. Das Wachstum in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Nva-FMDP ist nicht von dem einer unbehandelten Kultur zu unterscheiden.

Alle Konzentrationen sind in  $\mu$ g/ml angegeben.

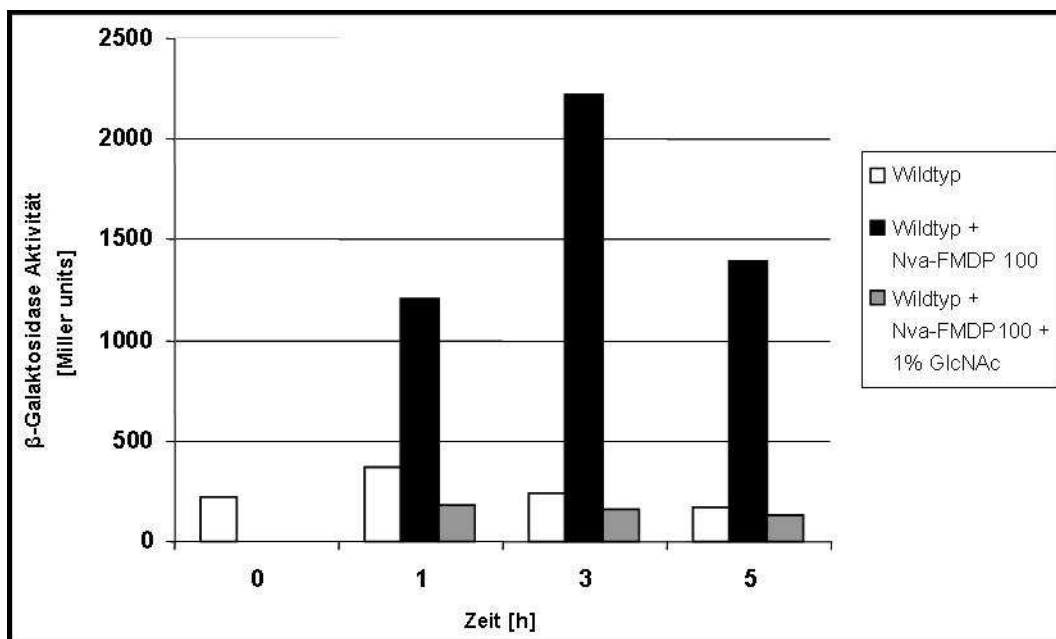
Die Aktivität von GlmS ist redundant, falls eine externe Quelle für Aminosucker zur Verfügung steht (siehe 3.3.1.).

Demzufolge wurde postuliert, dass eine Zugabe von GlcNAc, welches die enzymatischen Aktivität von GlmS ersetzen kann, den aktivierenden Effekt von Nva-FMDP auf die der *glmUS-lacZ*-Reporterfusion aufhebt. LB-Medium (siehe 2.2.1.) wurde mit dem Wildtypstamm mit chromosomaler *glmUS-lacZ*-Reporterfusion (Z9) inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 inkubiert. Dann wurde die Kultur in drei Teile aufgespalten. Ein Teil wurde unverändert weiter inkubiert, ein Teil wie beschrieben mit 100 µg/ml Nva-FMDP induziert, und der dritte Teil mit 100 µg/ml Nva-FMDP induziert und mit 1% (w/v) GlcNAc komplementiert (siehe Abb. 4.15.). Nach 1 h, 3 h und 5 h wurden Proben entnommen und die Aktivität der Reporterfusion mittels β-Galaktosidase-Assay (siehe 3.3.4.) bestimmt.

Die Aktivität des unbehandelten Wildtyp-Stammes Z9 liegt wie zuvor bereits mehrfach beobachtet bei etwa 200 Miller units (siehe Abb. 4.15. weiße Balken), während die Zugabe von Nva-FMDP, ebenfalls wie zuvor beobachtet, zu einer etwa 10fach erhöhten Aktivität nach 3 h führt (2100 Miller units, siehe Abb. 4.15. schwarze Balken).

Wird dem Stamm jedoch parallel zur Induktion mit Nva-FMDP eine externe Aminosuckerquelle in Form von GlcNAc angeboten, so ist lediglich eine β-Galaktosidase-Aktivität von 130 Miller units zu beobachten (vergleiche Abb. 4.15. graue Balken). Der reprimierende Effekt von GlcNAc gegenüber dem unbehandelten Stamm ist durch die Wirkung von externen Aminosuckerquellen auf die Promotoren vor *glmU* zurückzuführen (vergleiche Abb. 4.15. weiße und graue Balken, siehe auch 2.3.).

Wird dem Stamm jedoch parallel zur Induktion mit Nva-FMDP eine externe Aminosuckerquelle in Form von GlcNAc angeboten, so ist lediglich eine β-Galaktosidase-Aktivität von 130 Miller units zu beobachten (vergleiche Abb. 4.15. graue Balken Balken). Der reprimierende Effekt von GlcNAc gegenüber dem unbehandelten Stamm ist durch die Wirkung von externen Aminosuckerquellen auf die Promotoren vor *glmU* zurückzuführen (vergleiche Abb. 4.15. weiße und graue Balken, siehe auch 2.3.).



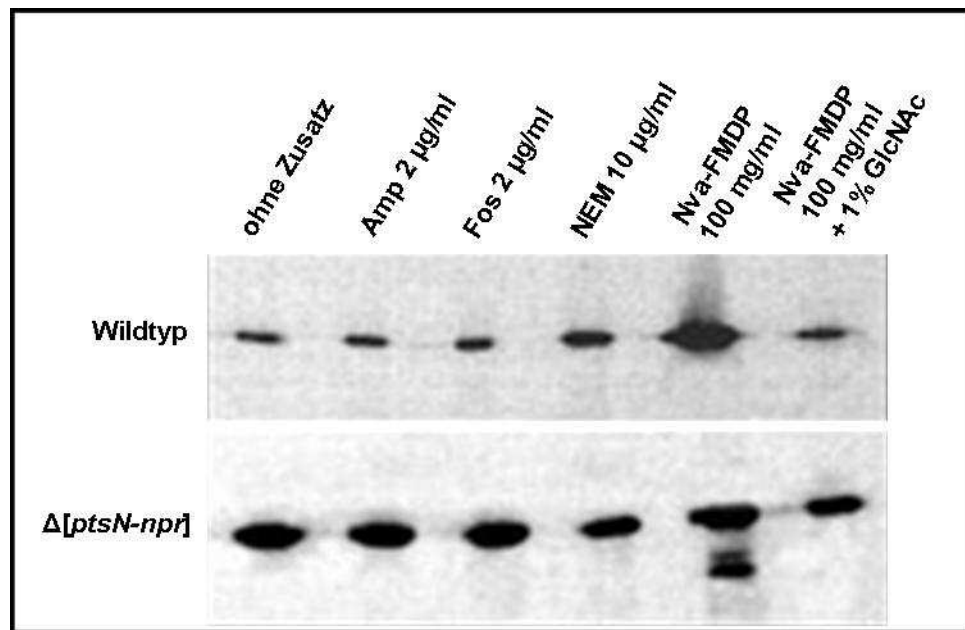
**Abb. 4.15.:** Die Wirkung von Nva-FMDP auf die Aktivität der *glmUS-lacZ*-Reporterfusion kann durch eine externe Aminosuckerquelle aufgehoben werden.

Der Wildtyp mit chromosomaler *glmUS-lacZ*-Reporterfusion (Z9) wurde bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,3 in LB-Medium inkubiert. Die Kultur wurde aufgespalten: Ein Teil wurde weiterhin in LB-Medium ohne Zusatz inkubiert (weiße Balken), ein Teil mit 100  $\mu$ g/ml Nva-FMDP induziert (schwarze Balken) und ein Teil mit 100 mg/ml Nva-FMDP induziert bei gleichzeitiger Zugabe von 1% (w/v) GlcNAc (graue Balken). Zum Zeitpunkt des Aufspaltens sowie 1 h, 3 h und 5 h danach wurden Proben zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (siehe 2.3.4.) entnommen.

Die Anwesenheit von 1% GlcNAc hebt den Effekt des Nva-FMDPs auf die Reporteraktivität vollständig auf.

Somit kann bestätigt werden, dass die aktivierende Wirkung von Nva-FMDP auf die *glmUS-lacZ*-Reporterfusion auf einer Reduktion des intrazellulären GlcN-6-P-Spiegels aufgrund einer Hemmung der enzymatischen Aktivität von GlmS zurückzuführen ist.

Diese Aussage wird auch durch eine Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen GlmS (siehe 3.7.7.) unter Verwendung von Proteinrohextrakten aus dem Wildtyp-Stamm R1279 und der [*ptsN-npr*]-Deletion R2413 unter Induktion mit den zuvor beschriebenen subinhibitorischen Konzentrationen der Wirkstoffe unterstützt (siehe Abb. 4.16.) Hierzu wurden die Stämme in LB-Medium inkubiert, bis sie eine  $OD_{600}$  von 0,3 erreichten. Dann wurden sie mit den genannten subinhibitorischen Wirkstoffkonzentrationen induziert und nach weiteren 3 h Inkubation geerntet. Während die Induktion des Wildtyps mit Ampicillin, Fosfomycin und NEM keinerlei Effekt auf die GlmS-Menge hat, ist bei Induktion mit Nva-FMDP eine deutliche Verstärkung des GlmS-Signals detektierbar. Dieser Effekt wird wie erwartet durch die Zugabe von 1% (w/v) GlcNAc aufgehoben.



**Abb. 4.16: Analyse der GlmS-Menge bei Inhibition von Schritten des anabolen Aminozuckermetabolismus**

Der Wildtyp (R1279) sowie die Stämme  $\Delta[ptsN-npr]$  (R2413),  $\Delta yhbJ$  (Z24),  $rne^{TS} yhbJ::cat$  (Z52) und  $rne^+ yhbJ::cat$  (Z53) wurden in LB-Medium inkubiert, bis sie eine OD600 von 0,3 erreichten und dann mit subinhibitorischen Konzentrationen der aufgeführten Stoffe induziert. 3 h danach wurden Zellen geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt (siehe 3.7.1.) und wie unter 3.7.7. beschrieben eine Western Blot Analyse unter Verwendung polyklonaler Antikörper gegen GlmS durchgeführt.

Ampicillin (Amp), Fosfomycin (Fos) und N-Ethylmaleimid (NEM) haben keinen Einfluß auf die intrazelluläre GlmS-Menge. Unter Induktion mit Nva-FMDP hingegen ist ein deutlich verstärktes GlmS-Signal detektierbar. Dieser Effekt kann durch die Zugabe von 1% (w/v) GlcNac als externe Aminozuckerquelle aufgehoben werden.

w/o= ohne Zugabe, Amp= Ampicillin, Fos= Fosfomycin, NEM= N-Ethylmaleimid

In einem  $[ptsN-npr]$ -Deletionsstamm (R2413) hingegen ist unter allen Bedingungen eine große Menge GlmS detektierbar, welcher nicht durch die Zugabe von Nva-FMDP zusätzlich erhöht werden kann. Die Zugabe von GlcNac hingegen reduziert die Proteinmenge von GlmS nur leicht. Dies unterstützt die Annahme, dass die Metaboliten-abhängige Regulation der GlmS-Menge strikt von der Anwesenheit von funktionsfähigen YhbJ abhängig ist.

Untersuchungen durch korrespondierende Northern Blot Analysen mit einer DIG-markierten Sonde gegen *glmS*, bei denen Gesamt-RNA aus dem Wildtyp R1279 unter Induktion durch subinhibitorische Konzentrationen der Wirkstoffe benutzt wurden, führten ebenfalls zu Ergebnissen, die bestätigen, dass die beobachtete Induktion der GlmS-Synthese auf dem in 4.1. beschriebenen regulatorischen Ereignis beruht (Kalamorz *et al.* 2007).

Die Aufgabe des regulatorischen Ereignisses, das in 4.1. untersucht wurde, ist somit Induktion der GlmS-Synthese im Falle eines niedrigen GlcN-6-P-Spiegels. Es handelt

sich somit um einen klassischen negativen Feedback-Mechanismus, in dem die Expression des Gens eines Enzyms durch dessen Produktmenge kontrolliert wird.

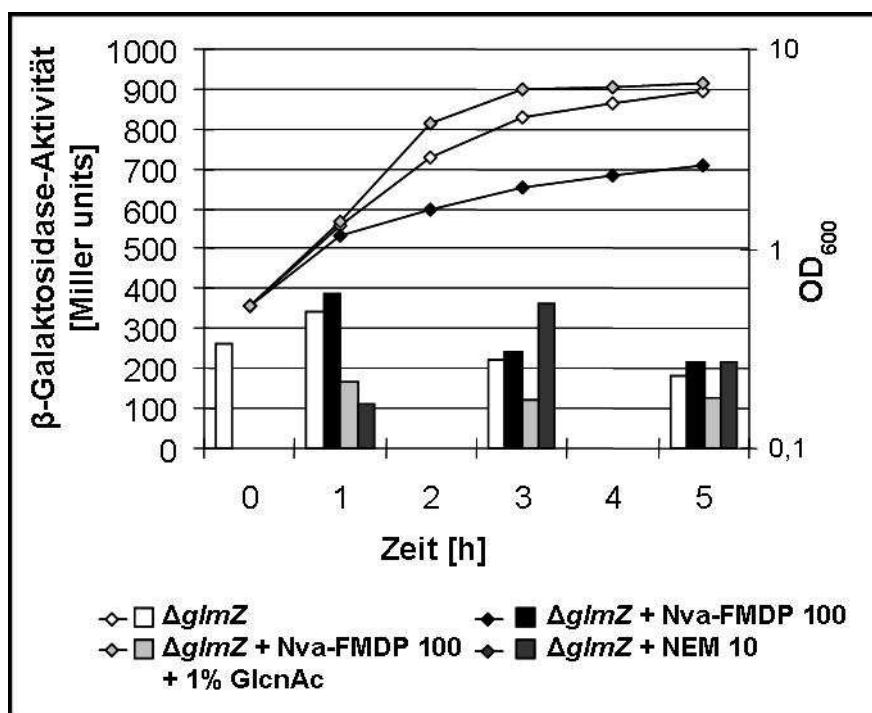
#### 4.2.3. Die Rolle von GlmZ in der metabolitengesteuerten Regulation der *glmS*-Expression

Da gezeigt werden konnte, dass die Anpassung der *glmS*-Expression in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von GlcN-6-P durch das in 4.1. beschriebene regulatorische Ereignis geschieht, sollte nun die Rolle von GlmZ in diesem System untersucht werden. Um näheren Einblick zu erlangen, wurde der Einfluß von Nva-FMDP auf einen  $\Delta$ *glmZ*-Stamm (Z40, siehe Tabelle 7.1.) getestet. Hierzu wurde LB-Medium mit diesem Stamm bei 37°C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3 erreicht wurde. Die Kultur wurde nun in vier Teile aufgespalten: Einer wurde ohne Zusatz weiter inkubiert und den anderen entweder 100 mg/ml Nva-FMDP, 100 mg/ml Nva-FMDP und 1% (w/v) GlcNAc oder 10 µg/ml NEM zugesetzt (Zeitpunkt t<sub>0</sub>). Das Wachstum der Kulturen wurde stündlich protokolliert, und nach 1 h, 3 h und 5 h Proben für die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (siehe 3.3.4.) entnommen. Abb. 4.17. gibt die Ergebnisse dieses Versuches wieder. Zunächst ist zu bemerken, dass die Deletion von *glmZ* keinen Einfluß auf das Wachstum hat. Wie der korrespondierende Wildtyp-Stamm Z9 erreicht auch der  $\Delta$ *glmZ*-Stamm Z40 nach 3 h eine OD<sub>600</sub> von 3 (vergleiche Abb. 4.10.).

Der *glmZ*-Deletionsstamm zeigt jedoch bemerkenswerter Weise ein verringertes Wachstum bei Inkubation in Anwesenheit von Nva-FMDP: Dieses verläuft deutlich langsamer und die Zelldichte erreicht keinen OD<sub>600</sub>-Wert höher als 2,6 (siehe Abb. 4.17. Zeitpunkt 5). Dieser Defekt kann durch die Zugabe einer externen Aminozuckerquelle aufgehoben werden, in Anwesenheit von 100 mg/ml Nva-FMDP und 1% (w/v) GlcNAc erreichen Wachstumsrate und Zelldichte die Werte der unbehandelten Kultur.

Desweiteren ist im  $\Delta$ *glmZ*-Hintergrund keinerlei Reaktion der *glmUS-lacZ*-Reporterfusion auf die Zugabe von Nva-FMDP messbar, lediglich der bekannte, etwa dreifach reprimierende Effekt des GlcNAc auf die Promotoren vor *glmU* kann detektiert werden (vergleiche 2.3.).





**Abb. 4.17.: Die Wirkung von Nva-FMDP auf die Aktivität der *glmUS-lacZ*-Reporterfusion in Abwesenheit von GlmZ.**

Der  $\Delta glmZ$  Stamm mit chromosomaler *glmUS-lacZ*-Reporterfusion (Z40) wurde bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,3 in LB-Medium inkubiert. Die Kultur wurde aufgespalten: Ein Teil wurde weiterhin in LB-Medium ohne Zusatz inkubiert, ein Teil mit 100 mg/ml Nva-FMDP beziehungsweise 40  $\mu$ g/ml N-Ethylmaleimid induziert und ein Teil mit 100 mg/ml Nva-FMDP induziert bei gleichzeitiger Zugabe von 1% (w/v) GlcNAc. Zum Zeitpunkt des Aufspaltens sowie 1 h, 3 h und 5 h danach wurden Proben zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (siehe 3.3.4.) entnommen.

Der  $\Delta glmZ$ -Stamm zeigt keinerlei Wachstumsdefekt und auch die Zugabe von NEM hat keine Auswirkung auf die Wachstumsrate (Daten nicht gezeigt).

Unter Induktion mit Nva-FMDP kommt es zu einer deutlichen Verlangsamung des Wachstums und die  $OD_{600}$  erreicht keinen Wert über 2,6. Dieser hemmende Effekt kann durch die Zugabe von 1% (w/v) GlcNAc aufgehoben werden, in diesem Fall ist das Wachstumsverhalten nicht von dem der unbehandelten Kultur zu unterscheiden.

Im Gegensatz zum Wildtypstamm (vergleiche Abb. 3.14.) kommt es in Abwesenheit von *glmZ* zu keiner erhöhten Aktivität der Reporterfusion unter Induktion mit Nva-FMDP.

Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass GlmZ ein essentieller Bestandteil für das regulatorische Ereignis ist, über das die GlmS-Expression an die Verfügbarkeit von intrazellulären GlcN-6-P angepasst wird, und dass ein *glmZ*-Deletionsstamm nicht mehr in der Lage ist, dieses Regulationsereignis auszuführen. Zudem erklärt diese Untersuchung die unerwartete hohe Resistenz von *E. coli* gegenüber FMDP-Derivaten: Falls die enzymatische Aktivität von GlmS durch FMDP inhibiert wird, besteht die Antwort der Zelle aus einer posttranskriptionellen Stabilisierung der *glmS*-spezifischen mRNA (Kalamorz *et al.* 2007), was eine erhöhte GlmS-Synthese bewirkt. So kann der Verlust an enzymatischer Aktivität sehr schnell ausgeglichen werden. Erst durch eine Inaktivierung von GlmZ, beispielsweise durch Deletion des korrespondierenden Gens, wird diese Antwort auf eine geringe

Verfügbarkeit von GlcNAc-6-P ausgeschaltet, so dass die Zelle nun empfindlich für die Wirkung des FMDPs ist.

Des Weiteren unterliegt diese Antwort einer Kontrolle durch YhbJ, da in Abwesenheit dieses Proteins eine vom GlcN-6-P-Spiegel entkoppelte konstitutive Aktivierung des Mechanismus zu beobachten ist.

### **4.3. Charakterisierung von YhbJ**

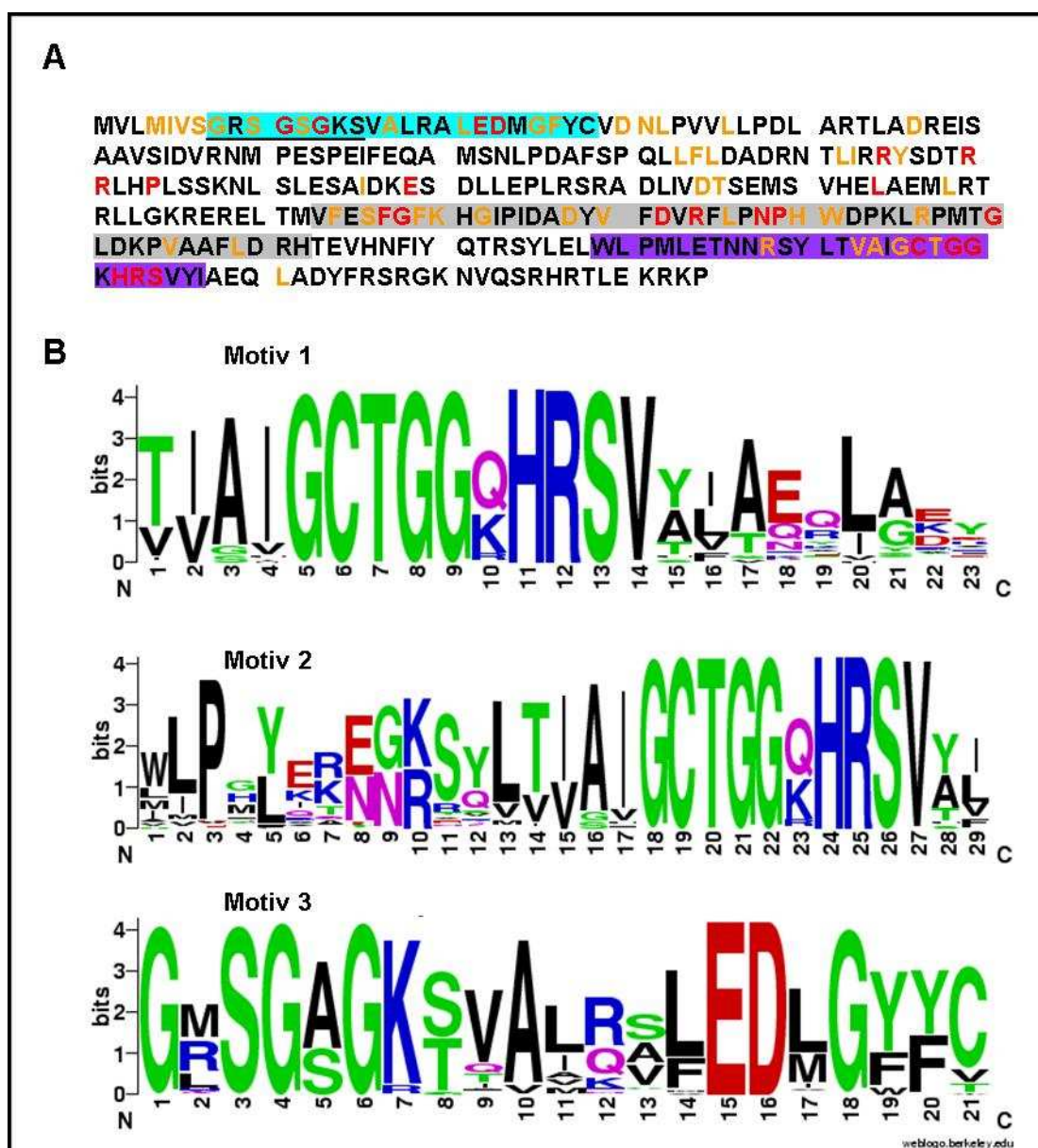
Aufgrund der zentralen Bedeutung von YhbJ in der Regulation der *glmS*-Expression wurden verschiedene Datenbank-Analysen durchgeführt, um dieses Protein weitergehend zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Datensatz aus 125 Homologen zusammengestellt, indem das *multiple genome alignment* von [microbesonline.com](http://microbesonline.com) (siehe 3.9.) sowie BLAST-Suchen (Altschul *et al.* 1990) gegen YhbJ aus *E. coli* und dem Homolog YvcJ in *B. subtilis* (Görke *et al.* 2005) genutzt wurden. Es wurden Sequenzen berücksichtigt, die eine Homologie von mindestens 50% aufwiesen. Hierbei ist zu beachten, dass YhbJ aus *E. coli* und YvcJ aus *B. subtilis* lediglich eine Übereinstimmung von 39% aufweisen. Der gesamte Datensatz ist unter 7.6. im Anhang zu finden. Alle Positionsangaben beziehen sich, soweit nicht anders genannt, auf YhbJ aus *E. coli*.

#### 4.3.1. Analyse mittels ClustalW und MEME

Der ClustalW-Algorithmus dient der Identifikation konservierter Aminosäurereste durch Sequenz Alignment (Larkin *et al.* 2007). Im Falle von YhbJ konnten durch diese Analyse 23 Aminosäuren identifiziert werden, die in allen verwendeten Sequenzen perfekt konserviert sind sowie 26 weitere Aminosäuren, die hinsichtlich Größe und Ladung übereinstimmen (siehe Abb. 3.18.A. und Anhang 7.6.).

Mittels MEME-Analyse ist es möglich, konservierte Motive in Gruppen verwandter DNA- oder Aminosäuresequenzen zu identifizieren (Bailey *et al.* 2006). Durch diesen Algorithmus wurden drei Motive gefunden, die in den Sequenzen aller verwendeten Homologe zu finden sind und die einen Großteil der konservierten Aminosäurereste enthalten (siehe Abb. 4.18.B.).



#### Abb. 4.18.: Sequenzanalyse von YhbJ und Homologen

Es wurden 125 Sequenzen von Homologen des Proteins YhbJ aus *E. coli* für eine Analyse mittels ClustalW und MEME genutzt.

(A) Sequenz von YhbJ aus *E. coli*. Rot dargestellte Aminosäuren sind in allen 125 Sequenzen perfekt konserviert. Orange dargestellte Aminosäuren sind im Kontext von Größe und Ladung konserviert. Das potentielle Walker A-Motiv ist unterstrichen. Motiv 1 aus der MEME-Analyse ist in violett unterlegt, Motiv 2 in grau und Motiv 3 in türkis.

(B) Weblogo-Darstellung der drei mittels MEME gefundenen Motive. Die dargestellte Größe der Buchstaben korreliert zum Grad der Konservierung der jeweiligen Aminosäure.

Motiv 1 umfasst die Aminosäuren 163 bis 212 und beinhaltet 7 perfekt konservierte Aminosäuren und 13 hinsichtlich Größe und Ladung konservierte Aminosäuren.

Motiv 2 befindet sich im C-terminalen Bereich und besteht aus den Aminosäuren 238 bis 256. In ihm sind 6 perfekt konservierte Aminosäuren enthalten, die sich alle in der C-terminalen Hälfte des Motivs befinden, sowie 5 hinsichtlich Größe und Ladung konservierter Aminosäuren, von denen ebenfalls 4 in der C-terminalen Hälfte des Motivs lokalisiert sind.

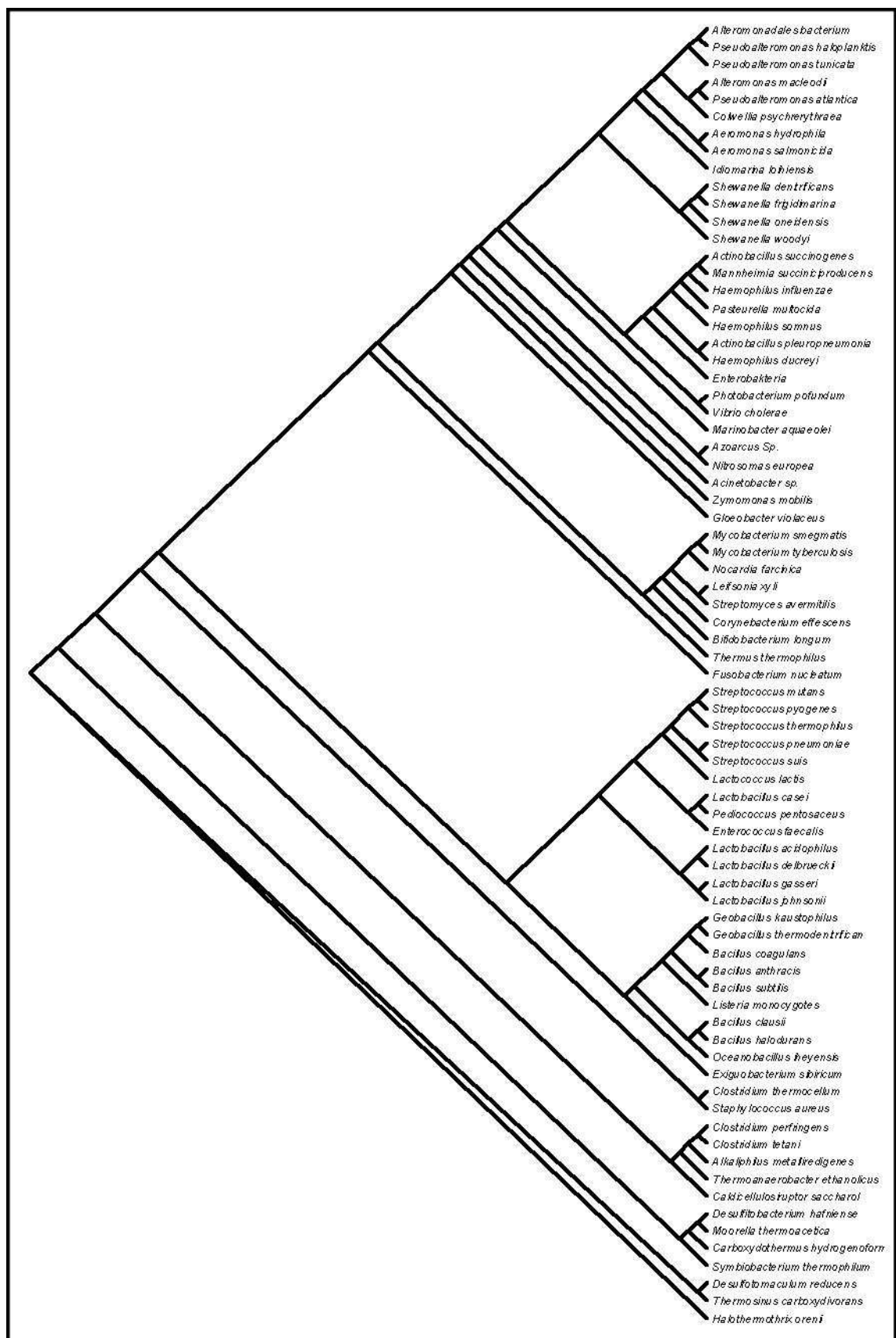
Motiv 3 schließlich liegt im N-terminalen Bereich des Proteins und beinhaltet ein Walker A-Motiv mit der Konsensus-Sequenz G-X<sub>4</sub>-G-(K/T) (Walker *et al.* 1982), welches durch die Aminosäuren 8 bis 15 gebildet wird. Walker A ist in P-loop ATPasen konserviert und ist an der Bindung von ATP und GTP beteiligt (Saraste *et al.* 1990). Viele Proteine mit einem Walker A-Motiv sind ATPasen (Smirnova *et al.* 1998) und eine Kinase-Aktivität konnte beispielsweise für die HPr-Kinase HprK aus *B. subtilis* gezeigt werden (Galinier *et al.* 2002). Das Motiv 3 in YhbJ umfasst die Aminosäuren 7 bis 28, unter denen sich 4 perfekt konservierte und 7 hinsichtlich Größe und Ladung konservierte Aminosäuren befinden.

Die Motivabfolge 3-1-2 ist konserviert, mit Ausnahme von *Desulfotomaculum reducens* UPF0042, in welchem das Motiv 3 doppelt vorliegt, was zu der Abfolge 3-3-1-2 führt, sowie *Nitrosomas europea* NE1849, welches ein doppeltes Motiv 2 aufweist, und zwar in der Abfolge 3-2-1-2.

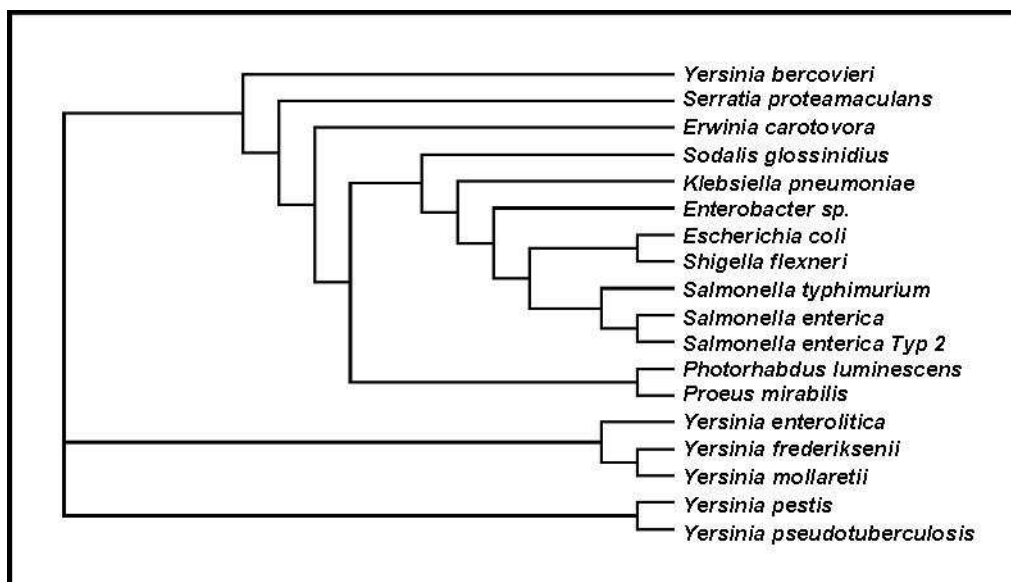
### 4.3.2. Phylogenetische Analyse

Unter Verwendung der aus der ClustalW-Analyse erhaltenen Daten wurde mittels TreeView (Copyright R.D.M Page 2001) ein phylogenetischer Stammbaum der verwendeten Homologe erstellt (siehe Abb. 4.19) Der Übersichtlichkeit halber wurde in dieser Analyse bei mehreren Vertretern derselben Gattung, die sehr hohe Homologie zueinander aufwiesen, exemplarisch nur eine Sequenz aus diesen Gruppen verwendet. Zudem wurden die *Enterobacteriaceae* zu der Gruppe „Enterobakteria“ zusammengefasst, deren Position in Abb. 4.19. durch *E. coli* YhbJ repräsentiert wird und deren Verwandtschaft untereinander in Abb. 4.20. dargestellt ist.

Die weitverbreitete Konservierung des Proteins in Eubakteria ist als starker Hinweis auf eine funktionelle Konservierung anzusehen.



**Abb. 4.19.: Phylogenetischer Stammbaum der YhbJ-Homologe**  
 Erstellt aus einer ClustalW-Analyse von Homologen aus 75 Organismen mittels TreeView (siehe 2.9).



**Abb. 4.20.: Phylogenetischer Stammbaum der YhbJ-Homologe in Enterobakterien**  
Erstellt aus ClustalW-Analyse mittels TreeView (siehe 2.9). Dieser Stammbaum repräsentiert die „Gruppe: Enterobacteria“ in Abbildung 3.18.

#### 4.3.3. Identifikation einer potenziellen RNA-Bindedomäne

Aufgrund des Einflusses von YhbJ auf die Prozessierung der kleinen RNAs GlmY und GlmZ sollte überprüft werden, ob eine direkte Interaktion zwischen diesen Komponenten möglich ist. Mittels des RNABindR-Algorithmus lassen sich potenzielle RNA-Bindedomänen in Aminosäuresequenzen identifizieren, die an einer potenziellen Bindung von RNA beteiligt sind (Terribilini *et al.* 2007).

Verwendet man hierzu die Sequenz von YhbJ aus *E. coli*, so erhält man eine Vorhersage für ein potenzielles RNA-Bindemotiv, welches aus den Aminosäuren 251- 254, 256, 260-271 sowie 273-278 und 281-284 im äussersten C-terminalen Bereich des Proteins gebildet wird (siehe Abb. 4.21.).



**Abb. 4.21.: Potenzielles RNA-Bindemotiv von YhbJ**  
Mittels RNA-BindR wurden die in türkis unterlegten Aminosäuren als Teil einer potenziellen RNA-Bindedomäne am C-terminalen Ende des Proteins identifiziert.

Interessanterweise ist dieser Bereich gemäß der ClustalW-Analyse (vergleiche 4.3.1. und 7.6.) nicht stark konserviert, so dass weitere Sequenzen von YhbJ-Homologen

mittels RNABindR analysiert wurden. Hierbei zeigte sich, dass die am potenziellen RNA-Bindemotiv beteiligten Aminosäuren innerhalb der Gruppe: Enterobakteria (siehe Abb. 4.19. und Abb. 4.20.) vollständig konserviert sind und man für jedes Mitglied dieser Gruppe eine Vorhersage erhält, die mit der für YhbJ aus *E. coli* übereinstimmt. Im Gegensatz hierzu ergibt eine RNABindR-Analyse der Homologe aus *B. subtilis* (Motiv aus 13 Aminosäuren), *Clostridium perfringens* (7 Aminosäuren, die kein zusammenhängendes Motiv bilden), *Staphylococcus aureus* (3 Aminosäuren) und *Vibrio cholerae* (2 Aminosäuren) deutlich geringere Wahrscheinlichkeiten für die Anwesenheit eines entsprechenden Bindemotives, während einige andere wie *Listeria monocytogenes* Vorhersagen erhalten, die mit der für *E.coli* vergleichbar sind (Motiv aus 25 Aminosäuren). Die Vorhersagen sind im Anhang unter 7.6. zusammengefasst.

#### 4.3.4. Mutationsanalyse konservierter Reste und Motive in YhbJ

Nachdem durch die in 4.3.1. und 4.3.3. beschriebenen Analysen eine Vielzahl konservierter Aminosäuren und Motive in YhbJ identifiziert werden konnten, wurden nun Mutationsanalysen durchgeführt, um diesen eine funktionelle Bedeutung beizumessen.

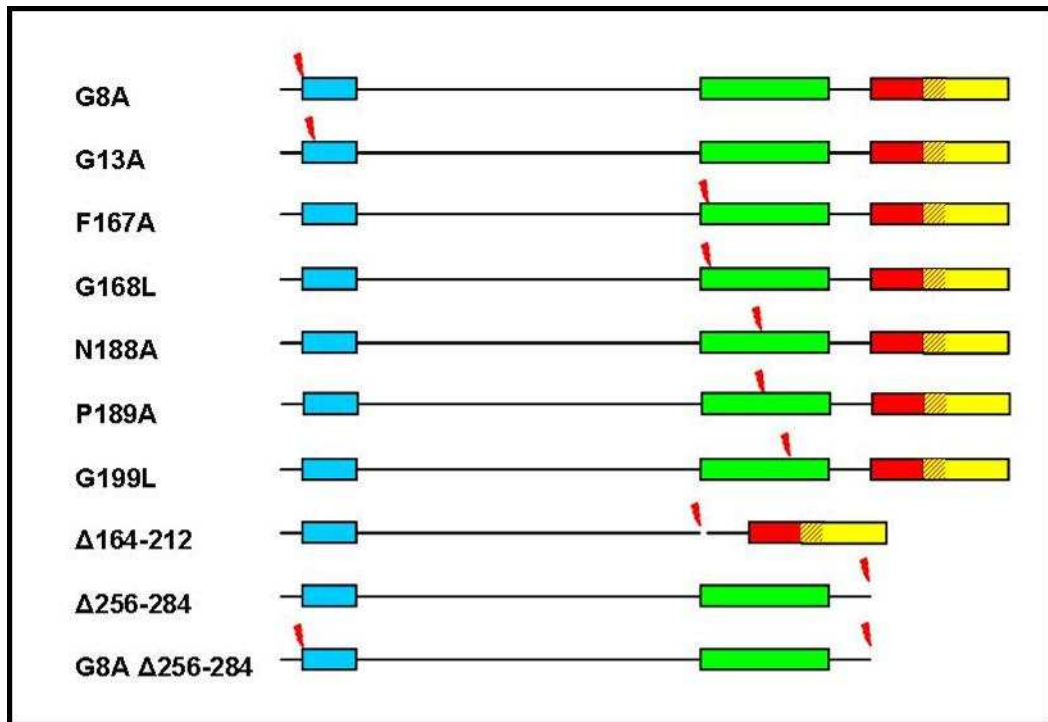
Hierzu wurden verschiedene mutierte Versionen von YhbJ unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors in das Plasmid pBAD33 integriert und zur Komplementation einer *yhbJ*-Mutante (Stamm Z28, siehe Tab. 7.1.) verwendet. Die Effektivität der Komplementation kann über die Aktivität einer im Chromosom verankerten *glmS-lacZ*-Reporterfusion bestimmt werden.

Es wurden folgende Mutationen und Deletionen verwendet:

<i>yhbJ</i> -Gly8Ala	(pBGG63)
<i>yhbJ</i> -[ΔAA 256-284]	(pBGG109)
<i>yhbJ</i> -Gly8Ala / [ΔAA 256-284]	(pBGG110)
<i>yhbJ</i> -Gly13Ala	(pBGG120)
<i>yhbJ</i> Δ AA164 – 212	(pBGG121)
<i>yhbJ</i> Phe167Ala	(pBGG122)
<i>yhbJ</i> Gly168Leu	(pBGG123)
<i>yhbJ</i> Asn188Ala	(pBGG125)
<i>yhbJ</i> Pro189Ala	(pBGG126)
<i>yhbJ</i> Gly199Leu	(pBGG127)



Die Positionen der einzelnen Mutationen sind in Abb. 4.22. schematisch dargestellt. Als Kontrollen wurden der korrespondierende Wildtyp Z8 (Negativkontrolle), der nicht-transformierte Stamm Z28 (Positivkontrolle), die beide eine chromosomale *glmS-lacZ*-Reporterfusion tragen (vergleiche Abb. 4.1.) sowie Z28 transformiert mit pBAD33 (Leervektor) und mit pBGG119 (authentisches *yhbJ* in pBAD33, vergleiche Tab.7.2.) verwendet.

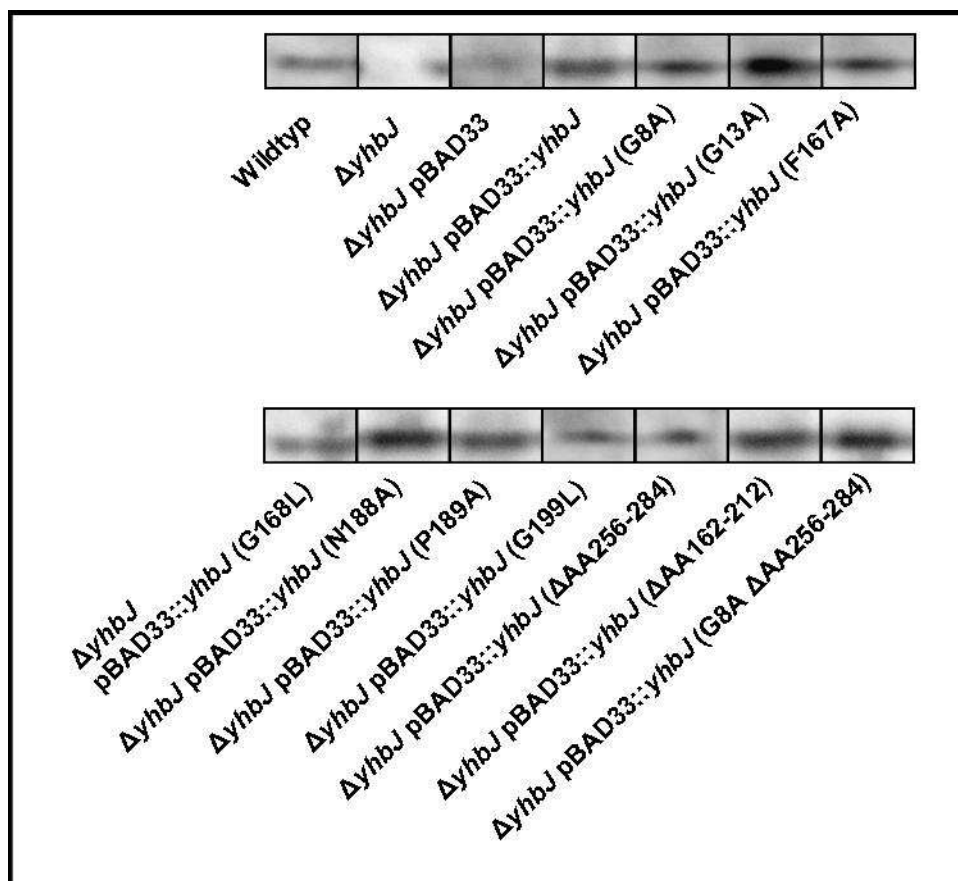


**Abb. 4.22.: Lokalisation der Deletionen und Aminosäureaustausche für die Mutationsanalyse von *yhbJ***

Maßstabsgerechte schematische Darstellung des *yhbJ*-Gens. Blaue Box = konserviertes Motiv 1, grüne Box = konserviertes Motiv 2, rote Box = konserviertes Motiv 3, gelbe Box = potenzielles RNA-Bindemotiv. Blitze symbolisieren Mutationen oder Deletionen. Für Details: Siehe 4.3.4.

Der Stamm Z28 wurde mit den Plasmiden, welche für die YhbJ-Mutanten kodieren, transformiert (siehe 3.3.3.) und die Expression der Proteine mittels Western Blot Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen YhbJ (siehe 3.7.7.) überprüft. Wie Abb 4.23. zeigt, werden alle Derivate stabil exprimiert.



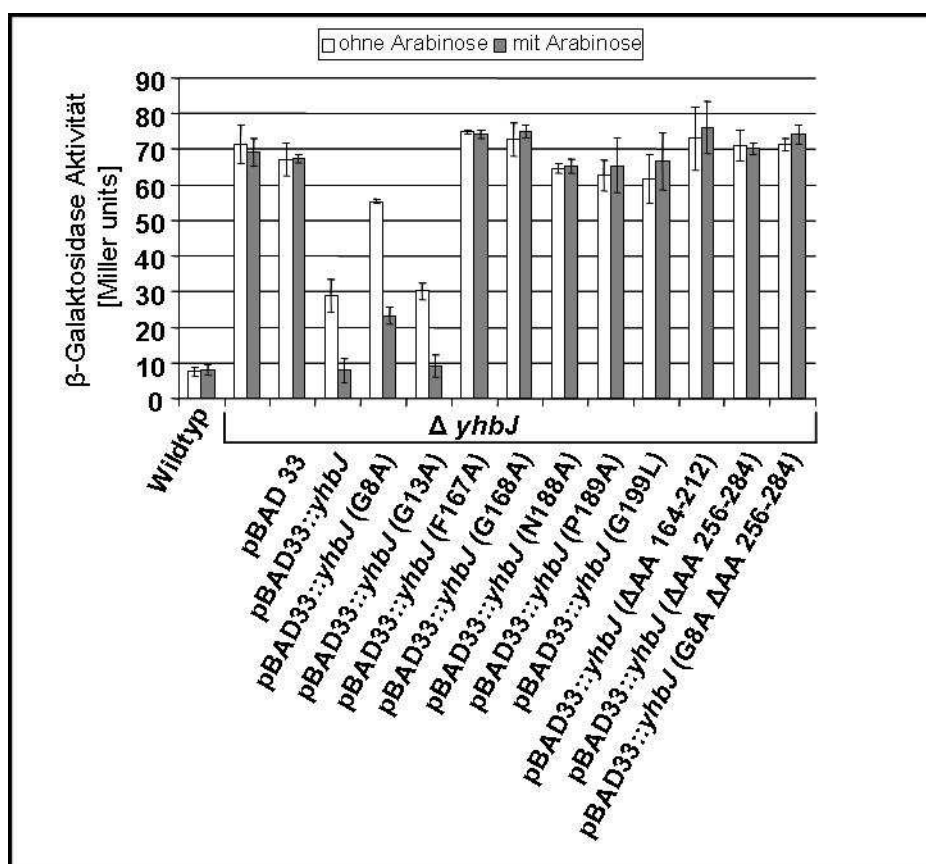


**Abb. 4.23.: Western Blot zur Überprüfung der stabilen Expression der *yhbJ*-Mutanten**

Der  $\Delta yhbJ$ -Stamm Z28 wurde mit den unter 4.3.4. beschriebenen Plasmiden und dem Ursprungsplasmid (pBAD33) transformiert und die Transformanten sowie der Ausgangsstamm und der korrespondierende Wildtyp (Z8) in LB-Medium mit 0,2% L-Arabinose inkubiert, bis sie eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreichten. Gesamtzellextrakte (siehe 3.7.1.) wurden dann mittels Western Blot Analysen (siehe 3.7.7.) unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen YhbJ analysiert.

Weder in der *yhbJ*-Deletion noch in der Deletion transformiert mit dem Ausgangsplasmid pBAD33 ist ein Signal detektierbar. In den restlichen Transformanten hingegen sind Signale vorhanden, die mindestens die Stärke des Signals im Wildtyp haben.

Anschließend wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der genannten Stämme und Transformanten bestimmt (siehe 3.3.4.). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 4.24. grafisch dargestellt. Der *yhbJ*-Deletionsstamm Z28 weist erwartungsgemäß eine gegenüber dem Wildtyp stark erhöhte Aktivität auf (70 Miller units zu 8 Miller units). Zudem zeigt die Transformation von Z28 mit dem Leervektor pBAD33 keinen Effekt auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Wird der Deletionsstamm Z28 mit authentischen *yhbJ* komplementiert, so ist die Expression der *glsS*-5'-lacZ-Reporterfusion bereits ohne Induktion durch Arabinose stark herabgesetzt, was auf eine basale Expression des plasmidständigen Gens in Abwesenheit des Induktors L-Arabinose zurückzuführen ist. Unter Induktion fällt die Aktivität der Reporterfusion auf das Niveau des Wildtyps zurück.



**Abb. 4.24.: Komplementation einer *yhbJ*-Deletion durch mutierte *yhbJ*-Derivate**

Der  $\Delta yhbJ$ -Stamm mit chromosomaler *glmS-lacZ*-Reporterfusion (Z28) wurde mit den in 4.3.4. genannten Plasmiden transformiert und in LB-Medium mit und ohne Induktion mit 20 mM L-Arabinose inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurde die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität (siehe 3.3.4.) bestimmt.

Mutationen im Walker A-Motiv (G8A und G13A) komplementieren eine *yhbJ*-Deletion unter Induktion mit Arabinose, während die Expression aller anderen Derivate keinen Effekt auf die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität hat.

Interessanterweise haben Aminosäure-Austausche innerhalb des Walker A-Motives nur wenig Auswirkung auf die Regulation der *glmS*-Expression, obwohl diese Reste im Motiv hoch konserviert sind. Bei der Gly13Ala-Mutante ist keinerlei Unterschied zum authentischen YhbJ zu erkennen. Die Transformante des Plasmids mit dem Gly8Ala-Austausch weist zwar auch unter Induktion noch eine zweifach erhöhte Expression der Reporterfusion auf, jedoch ist diese Aktivität nur ein Drittel der Aktivität in einer *yhbJ*-Deletion. Diese Daten lassen darauf schließen, dass das Walker A-Motiv nur eine untergeordnete Rolle in der Regulation der *glmS*-Expression spielt.

Alle weiteren Mutationen und Deletionen sind nicht in der Lage, eine *yhbJ*-Deletion zu komplementieren. Die Aktivität der *glmS-lacZ*-Reporterfusion ist in diesen Transformanten nicht von der Aktivität in einer *yhbJ*-Deletion unterscheidbar.

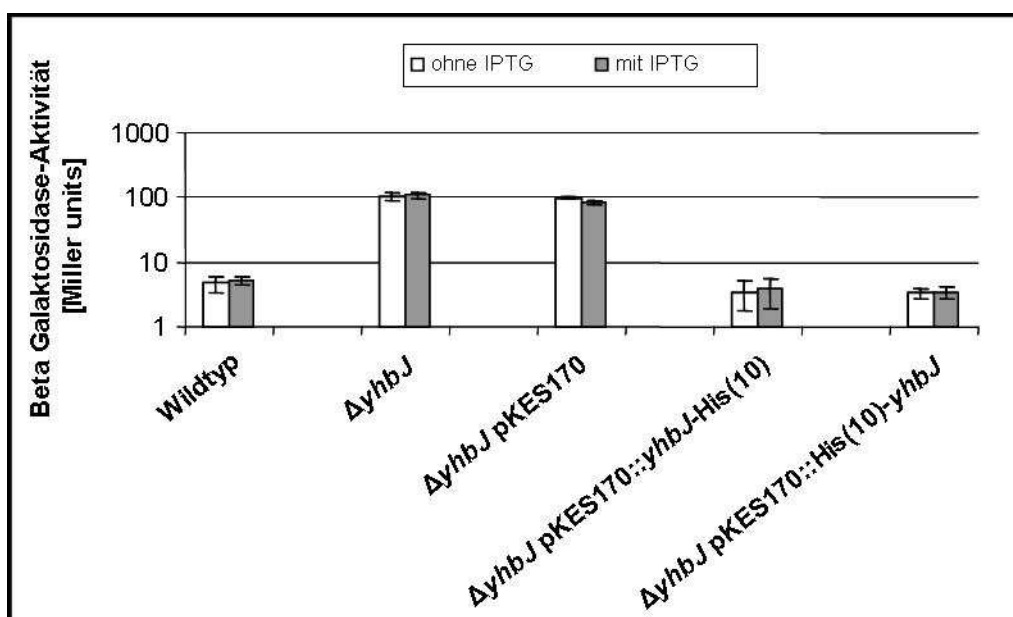
Dies zeigt, dass der Austausch dieser perfekt konservierten Aminosäuren oder die Deletion der konservierten Motive starke Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit von YhbJ hat.

#### 4.4. Untersuchungen zur Interaktion von YhbJ mit GlmY/GlmZ

Nachdem gezeigt werden konnte, dass zwei kleine RNAs eine wichtige Rolle in der Regulation der *glmS*-Expression spielen (Kalamorz et al. 2007; Urban et al. 2007; Reichenbach et al. 2008; Urban and Vogel 2008), sollte nun untersucht werden, ob eine direkte Interaktion von GlmY und GlmZ mit YhbJ vorliegt.

##### 4.4.1. Überexpression His(10)-YhbJ

Hierzu wurde zunächst Plasmide konstruiert, auf welchen *yhbJ* mit einem C-terminalen (pBGG161) beziehungsweise N-terminalen (pBGG162) 10x His-Tag unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors kodiert ist. Diese Fusionsproteine sind in der Lage, eine *yhbJ*-Deletion vollständig zu komplementieren (siehe Abb. 4.25.).



**Abb. 4.25.: Komplementation einer *yhbJ*-Deletion durch His-Tag-Fusionsproteine**

Ein  $\Delta yhbJ$ -Stamm mit chromosomaler *glmS-lacZ*-Reporterfusion (Z28) wurde mit Plasmiden transformiert, die das Gen für YhbJ mit einem N-terminalen His(10)-Tag (His(10)-*yhbJ*, pBGG162) oder mit einem C-terminalen His-Tag (*yhbJ*-His(10), pBGG161) unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors tragen. Zusätzlich wurde der Stamm mit dem Ursprungsplasmid pKES170 transformiert. Die Transformanten sowie der nicht transformierten Ausgangsstamm Z28 und der korrespondierenden Wildtyp (Z8) wurden in LB-Medium bei 37°C inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> erreicht wurde, und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Reporterfusion wurde wie unter 3.3.4. beschrieben bestimmt.

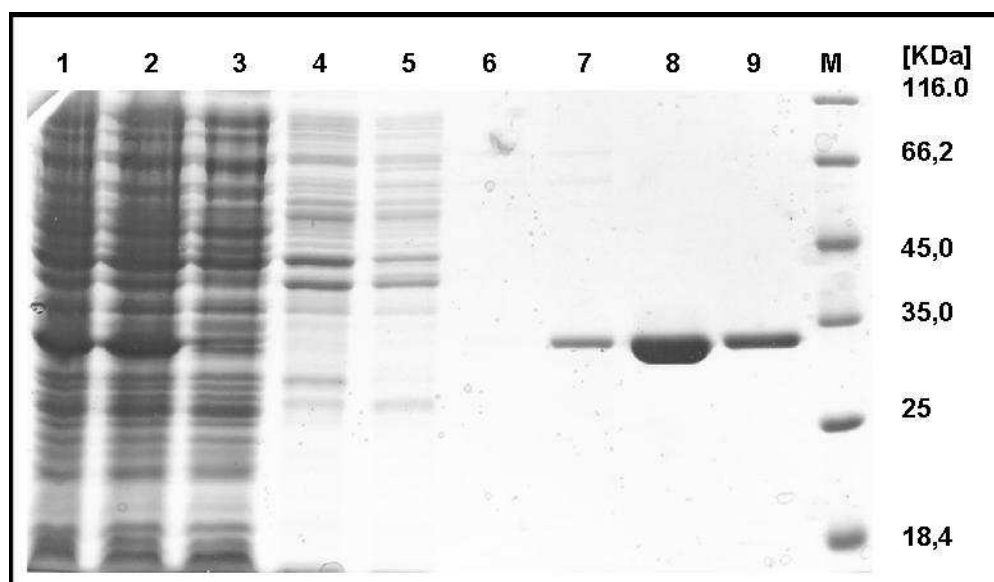
Während das Ursprungsplasmid pKES170 keinen Einfluß auf die Aktivität der Reporterfusion hat, komplementieren beide Plasmide, die für Fusionsproteine kodieren, vollständig.

Die stark erniedrigte Reporter-Aktivität in Anwesenheit der Plasmide, die für die Fusionsproteine kodieren, auch ohne Induktion mit IPTG ist auf eine hohe Basalexpression zurückzuführen.

An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass eine Fusion mit einem C-terminalen Tag zwar funktionell sind (also eine *yhbJ*-Deletion komplementieren kann), jedoch bindet das Fusionsprotein nicht an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulen. Dies weist darauf hin, dass C-terminale Tags nicht für die entsprechende Bindung zugänglich sind (Daten nicht gezeigt).

Die Expression des His(10)-YhbJ wurde wie unter 3.7.2. optimiert, wobei eine Induktion bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 für 1 h mit 1 mM IPTG als ideal für die Ausbeute bestimmt wurde.

Unter diesen Bedingungen wurde His(10)-YhbJ wie unter 3.7.3. beschrieben aufgereinigt. Abb. 4.25. zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer SDS-PAGE zur Überprüfung der Aufreinigung. Anschließend erfolgte eine Dialyse der 300 mM Imidazol-Elutionsfraktion (siehe 3.7.4.).



**Abb.4.26.: SDS-PAGE der Aufreinigung von His(10)-YhbJ**

Der Stamm DH5 $\alpha$  wurde mit einem Plasmid transformiert, das His(10)-YhbJ unter Kontrolle des induzierbaren P<sub>tac</sub>-Promotors kodiert. Die Transformante in LB-Medium inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde und dann mit 0,1 mM IPTG für 1 h induziert. Die Zellen wurden geerntet und die cytosolischen Proteine wie unter 3.7.1. beschrieben präpariert. Es folgte eine Aufreinigung des His(10)-YhbJ über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulen aufgereinigt (siehe 3.7.3.).

Es wurden 15  $\mu$ l jeder Fraktion mit 5  $\mu$ l 5x SDS-LAdepuffer aufgetragen, und das Gel nach der SDS-PAGE mit Coomassie Brilliant blue gefärbt(siehe 3.7.6.).

1= Rohzelleextrakt nach French Press, 2= Überstand nach Ultrazentrifugation, 3= Durchlauf der Säule, 4= Waschschrift 50 mM Imidazol, 5= Waschschrift 50 mM Imidazol, 6= Waschschrift 100 mM Imidazol, 7= Elutionsschrift 200 mM Imidazol, 8= Elutionsschrift 300 mM Imidazol, 9= Elutionsschrift 500 mM Imidazol, M= Marker. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist rechts angegeben.

Das rekombinante Protein eluiert spezifisch im Bereich von 200 mM Imidazol bis 500 mM Imidazol, hauptsächlich in der 300 mM Imidazol-Fraktion. Diese Fraktion wurde für die Dialyse (siehe 3.7.4.) verwendet.

#### 4.4.2. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Um eine Bindung zwischen YhbJ und den kleinen RNAs GlmY und GlmZ nachzuweisen wurden *Electrophoretic Mobility Shift Assays* durchgeführt. Bei diesen EMSAs werden die potenziellen Interaktionspartner in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander gemischt und inkubiert, und anschließend in einer nicht-denaturierenden, nativen, Gelelektrophorese, aufgetrennt. Hierbei migrieren Komplexe aus den beiden Interaktionspartnern distinkt von den einzelnen Komponenten, so dass sogenannte *Shifts* beobachtet werden können, falls es zu einer Komplexbildung kommt (Garner und Revzin 1981).

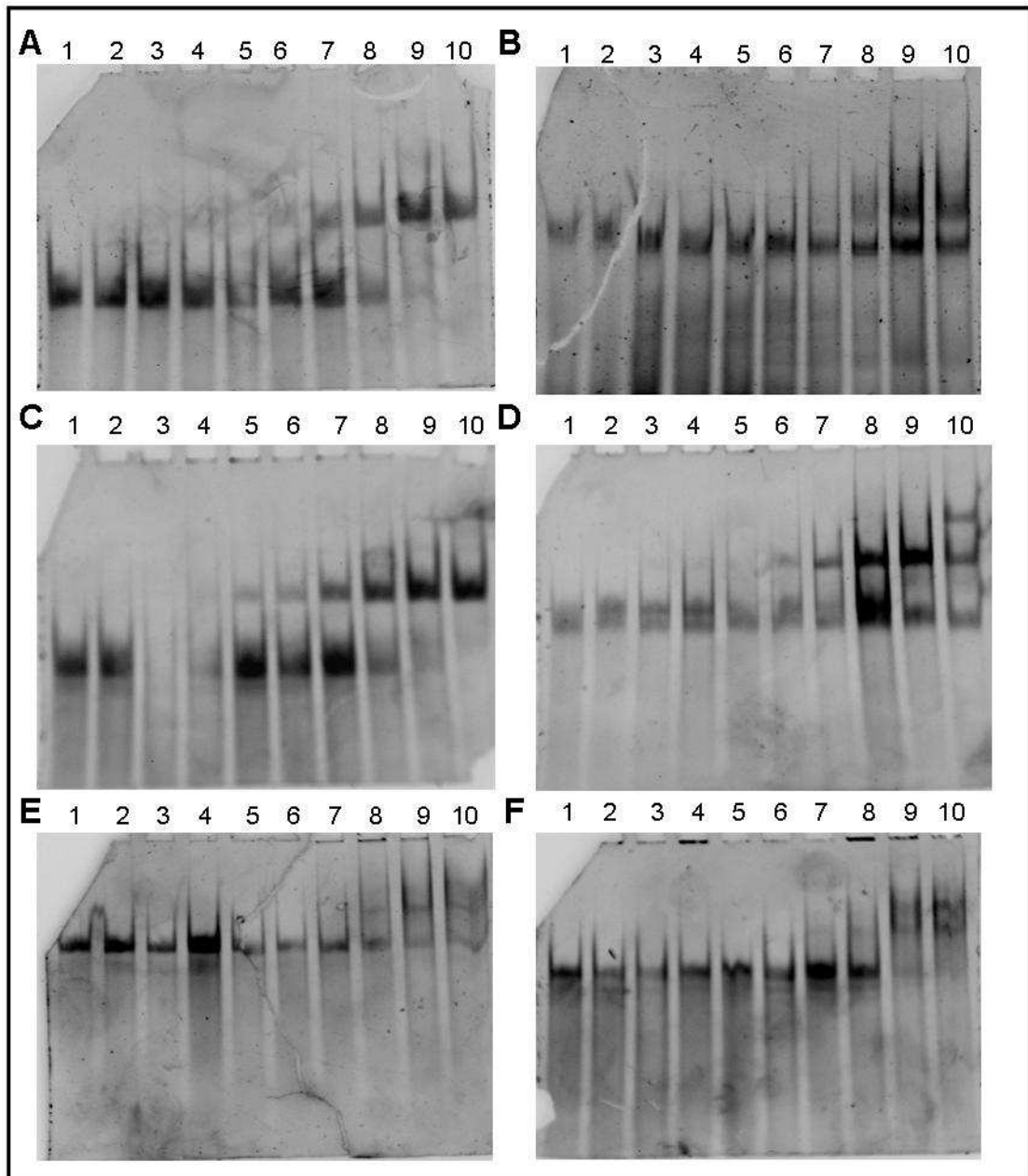
Für den EMSA wurde zum Einen das aufgereinigte His(10)-YhbJ (vergleiche 4.4.1.) verwendet, zum Anderen RNAs, die wie unter 3.6.3. beschrieben durch *in vitro* Transkription generiert wurden. Hierbei handelte es sich um die unprozessierte und prozessierte Formen von GlmY und GlmZ, um die sRNA SraC und einem RNA-Stück, das revers-komplementär zu SraC ist (SraC r/c) ist. Letztere dienen der Untersuchung der Bindspezifität von YhbJ. Die zur Generierung der Matrizen-DNA verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7.3. aufgeführt.

In einem ersten Satz Experimente wurden 30 pMol RNA mit aufsteigenden Konzentrationen His(10)-YhbJ von 0 pMol bis 40 pMol inkubiert und anschließend in 6% -PAA-Gelen mit TBE als Puffer aufgetrennt (siehe 3.8.1.) In diesen Experimenten konnte eine Komplexbildung bei jeder der verwendeten RNAs beobachtet werden (siehe Abb. 4.27.).

Für den EMSA mit His(10)-YhbJ und GlmY (prozessiert) (Abb. 4.27.A.) ist ein konzentrationsabhängiger Shift der RNA sichtbar, der bei einem Verhältnis Protein:RNA von 1:3 einsetzt und bei der Verwendung äquimolarer Mengen oder einem Überschuss an Protein in einen vollständigen Shift übergeht.

Bei dem EMSA mit GlmY (unprozessiert) (Abb. 4.27.B.) ist eine weniger deutliche Interaktion erkennbar. Erst bei Zugabe einer äquimolaren Menge Protein ist ein eindeutiger Shift sichtbar, jedoch ändert sich für einen Großteil der RNA das Laufverhalten nicht.

Die EMSAs mit GlmZ (prozessiert) (Abb. 4.27.C) und GlmZ (unprozessiert) (Abb. 4.27.D) zeigen ein ähnliches Bild wie die EMSAs mit den beiden Formen von GlmY. Zu beachten ist hier jedoch der zusätzliche zweite Shift bei GlmZ (unprozessiert) unter Verwendung von 40 pMol His(10)-YhbJ.



**Abb. 4.27.: EMSAs mit His(10)-YhbJ und verschiedenen RNAs**

Um eine Interaktion zwischen aufgereinigtem rekombinantem His(10)-YhbJ (siehe 4.6.1.) und durch *in vitro*-Transkription (siehe 3.6.3.) generierten RNAs zu untersuchen, wurden EMSAs wie unter 3.8.1. beschrieben durchgeführt.

(A) His(10)-YhbJ und GlmY (prozessiert), (B) His(10)-YhbJ und GlmY (unprozessiert), (C) His(10)-YhbJ und GlmZ (prozessiert), (D) His(10)-YhbJ und GlmZ (unprozessiert), (E) His(10)-YhbJ und SraC, (F) His(10)-YhbJ und SraC (*r/c*)

1= 30 pMol RNA ohne Protein, 2= 30 pMol RNA + 1 pMol His(10)-YhbJ, 3= 30pMol RNA + 2 pMol His(10)-YhbJ, 4= 30pMol RNA + 3 pMol His(10)-YhbJ, 5= 30pMol RNA + 4 pMol His(10)-YhbJ, 6= 30pMol RNA + 5 pMol His(10)-YhbJ, 7= 30pMol RNA + 10 pMol His(10)-YhbJ, 8= 30pMol RNA + 20 pMol His(10)-YhbJ, 9= 30pMol RNA + 30 pMol His(10)-YhbJ, 10= 30pMol RNA + 40 pMol His(10)-YhbJ

Es ist für alle verwendeten RNAs ein konzentrationsabhängiger Shift durch His(10)-YhbJ erkennbar.

Um die Spezifität der Interaktion von His(10)-YhbJ mit RNAs zu untersuchen, wurden EMSAs mit *in vitro*-transkribierter SraC und einer zu SraC revers-komplementären Sequenz (SraC *r/c*) durchgeführt. SraC (Abb. 4.27.E) zeigt eine schwache Interaktion

mit His(10)-YhbJ bei Verwendung von 20 pMol Protein oder mehr. Diese Interaktion ist in ihrem Muster mit dem Ergebnis des EMSA mit unprozessierten GlmZ vergleichbar, jedoch scheint die Interaktion schwächer zu sein.

SraC r/c (Abb. 4.27.F) zeigt einen Shift, wenn eine äquimolare Menge His(10)-YhbJ oder mehr eingesetzt wurde.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass His(10)-YhbJ in vitro mit RNA interagiert und einen stabilen Komplex bildet. Jedoch ist die Spezifität dieser Interaktion ungeklärt.

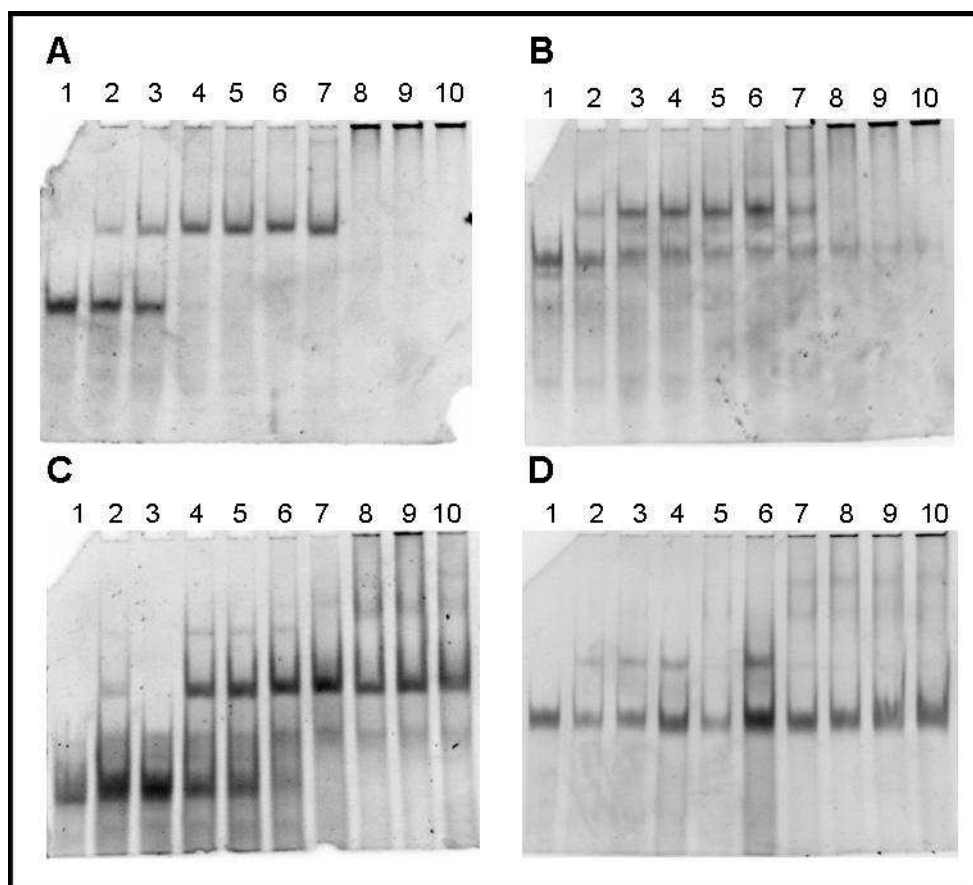
Um ein weiteres Spektrum an Mischungsverhältnissen abzudecken, wurden nachfolgend EMSAs mit einer RNA-Menge von 50 pMol und Proteinmengen 0 pMol bis 150 pMol durchgeführt (siehe Abb. 4.28.). Hierbei zeigten sich vergleichbare Ergebnisse wie in dem ersten Satz Experimente. Zusätzlich war nun ein zweistufiger Shift der RNA-Bande sichtbar. Im Falle von GlmY (prozessiert) tritt der erste Shift bereits bei Zugabe geringer Mengen His(10)-YhbJ auf (siehe Abb. 4.28.A Spur 2). Bei Zugabe von 30 pMol Protein oder mehr findet ein vollständiger erster Shift der RNA-Bande statt (siehe Abb. 4.28.A Spur 4 bis 10), während verstärkt der zweite Shift sichtbar wird. Wenn ein mindestens doppelter molarer Überschuss an His(10)-YhbJ zugesetzt wurde (siehe Abb. 4.28.A Spur 8 bis 10) ist ein vollständiger Übergang in den zweiten Shift zu erkennen.

Im Fall von GlmY (unprozessiert) folgt die Bindung einer unterschiedlichen Dynamik (siehe Abb. 4.28.B): Zwar findet auch hier sofort mit Zugabe von His(10)-YhbJ ein erster Shift statt (siehe Abb. 4.28.B. Spur 2), jedoch ist selbst bei sehr hohen Proteinmengen noch immer nicht-komplexierte RNA detektierbar (siehe Abb. 4.28.B. Spur 10). Interessanterweise geht der erste Shift jedoch wie im Fall von GlmY (prozessiert) bei Zugabe von 100 pMol Protein vollständig in den zweiten Shift über. Dies lässt Raum für die Vermutung, dass aus ungeklärter Ursache nicht alle RNA-Moleküle in diesem Ansatz für eine Interaktion mit His(10)-YhbJ zugänglich sind.

In einem entsprechenden EMSA mit GlmZ (prozessiert) zeigt dieses ein ähnliches Verhalten wie GlmY (prozessiert) (vergleiche Abb. 4.28.A. und C.). Bereits bei Anwesenheit sehr geringer Proteinmengen kommt es zu einem ersten Shift (siehe Abb. 4.28.C. Spur 2), jedoch findet hier ein vollständiger Übergang der RNA-Bande in den ersten Shift erst bei Proteinmengen größer als 50 pMol statt. Ebenso findet zwar ein von der eingesetzten Proteinmenge abhängiger Übergang in den zweiten Shift statt, jedoch

tritt dieser erst bei höheren Proteinmengen ein und ist selbst bei Verwendung eines dreifachen molaren Überschusses an His(10)-YhbJ unvollständig.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die prozessierten Formen von GlmY und GlmZ über denselben oder einen sehr ähnlichen Mechanismus mit His(10)-YhbJ interagieren, jedoch His(10)-YhbJ eine höhere Affinität zu GlmY (prozessiert) besitzt.



**Abb. 4.28.: EMSA mit His(10)-YhbJ und GlmY sowie GlmZ**

Um die Interaktion zwischen aufgereinigtem His(10)-YhbJ und der unprozessierten sowie prozessierten Form von GlmY beziehungsweise GlmZ näher zu charakterisieren, wurden EMSAs (siehe 2.8.1.) mit 50 pMol RNA und bis zu 150 pMol Protein durchgeführt.

(A) His(10)-YhbJ und GlmY (prozessiert), (B) His(10)-YhbJ und GlmY (unprozessiert), (C) His(10)-YhbJ und GlmZ (prozessiert), (D) His(10)-YhbJ und GlmZ (unprozessiert)

Es ist ein konzentrationsabhängiger Shift der RNA-Bande erkennbar. Details siehe Kapitel 3.6.2.

1= 50 pMol RNA ohne Protein, 2= 50 pMol RNA + 10 pMol His(10)-YhbJ, 3= 50 pMol RNA + 20 pMol His(10)-YhbJ, 4= 50 pMol RNA + 30 pMol His(10)-YhbJ, 5= 50 pMol RNA + 40 pMol His(10)-YhbJ, 6= 50 pMol RNA + 50 pMol His(10)-YhbJ, 7= 50 pMol RNA + 75 pMol His(10)-YhbJ, 8= 50 pMol RNA + 100 pMol His(10)-YhbJ, 9= 50 pMol RNA + 125 pMol His(10)-YhbJ, 10= 50 pMol RNA + 150 pMol His(10)-YhbJ.

Neben den bereits in Abb. 4.27. beobachteten Shifts ist nun für alle RNAs ein zweiter Shift bei hohen Proteinkonzentrationen zu beobachten (Einzelheiten siehe Text)

Ein EMSA mit GlmZ (unprozessiert) zeigt ein Bild, welches mit dem bei Verwendung von GlmY (unprozessiert) vergleichbar ist (Abb. 4.28.D.): Es kommt wie bei allen durchgeführten Experimenten zu einem sofortigen ersten Shift, wenn His(10)-YhbJ



zugesetzt wird, und dieser geht bereits ab einer Proteinkonzentration von mehr als 50 pMol vollständig in den zweiten Shift übergeht. Es sind jedoch auch bei Verwendung eines dreifachen molaren Überschusses noch deutliche Mengen nicht-komplexierter RNA nachweisbar. Demnach scheint es auch hier der Fall zu sein, dass ein Teil der RNA nicht zugänglich für eine Komplexbildung mit His(10)-YhbJ ist.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass His(10)-YhbJ in der Lage ist, Komplexe mit RNA-Molekülen zu bilden. Hierbei zeigt sich eine Präferenz zum Einen zu GlmY, zum Anderen zu den prozessierten Formen der RNAs.

Desweiteren bindet His(10)-YhbJ im EMSA jede verwendete RNA, einschließlich die funktionell nicht verwandten sRNA SraC, eine Sequenz, die revers-komplementär zu SraC ist sowie die kleine RNA SraF und ein RNA-Stück, dass 200 bp der *lacZ*-mRNA repräsentiert (Daten nicht gezeigt).

#### 4.5. Expression des *rpoN*-Operons

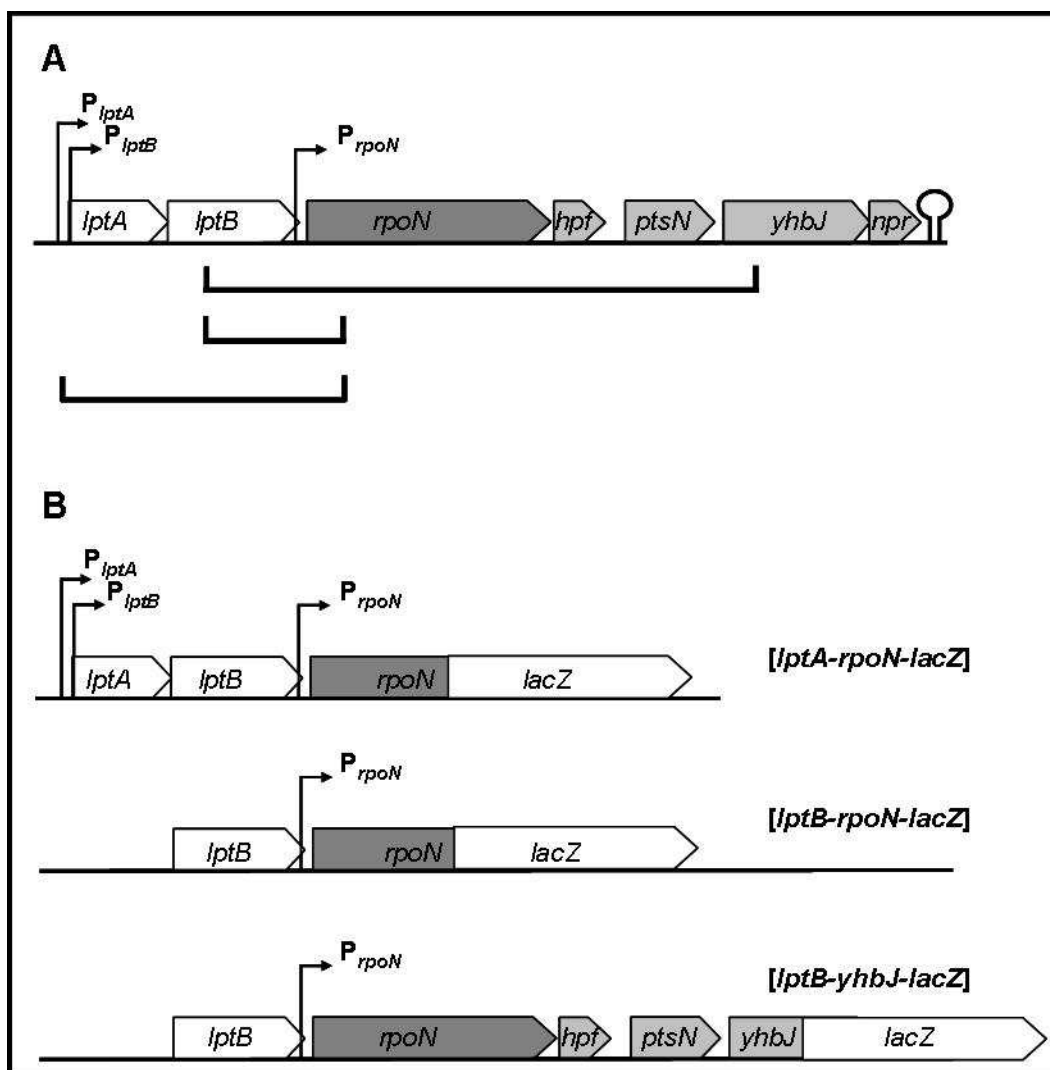
Das Muster der Expression des *rpoN*-Operons ist bislang ungeklärt. Es wurden Transkripte nachgewiesen, die entweder das gesamte Operon umfassen und ihren Startpunkt am  $\sigma^{70}$  Promotor vor *rpoN* haben, sowie Transkripte, die auf einem Durchlesen ausgehend vom *lptB*-Promotor beruhen und somit zusätzlich zum *rpoN*-Operon auch *lptB* und Bereiche stromaufwärts von dessen Startpunkt umfasst (Rhodius 2005, vergleiche auch 1.2.). Jedoch ist unklar, zu welchem Maß diese Einzelaktivitäten zur Gesamt-Expression des Operons beitragen.

Zusätzlich gibt es Berichte über eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, wenn Fragmente stromabwärts des beschriebenen *rpoN*-Promotors zwischen *rpoN* und *yhbJ* an *lacZ* fusioniert werden (Powell *et al.* 1995). Zwischen den Genen *hpf* und *ptsN* befindet sich ein intergenischer Bereich von 120 bp. Für die korrespondierende mRNA kann mittels mFold (Zuker 2003) eine Haarnadelstruktur vorhergesagt werden, die die Ribosomenbindestelle von *ptsN* überdecken würde und welche zudem eine potenzielle Bindestelle für die kleine RNA GlmZ darstellen könnte (B. Görke, persönliche Kommunikation).

Desweiteren ist im 3'-Bereich dieser intergenischen Region eine Sequenz mit Homologie zu der beschriebenen NagC-Bindestelle (El Qaidi *et al.* 2008) lokalisiert, die mit der letzten Base des *hpf*-Gens überlappt.

4.5.1. Untersuchung zur Expression des *rpoN*-Operons mittels *lacZ*-Reporterfusionen

Um den bekannten Promotoren, die zur Expression des *rpoN*-Operons beitragen, eine Einzelaktivität zuzuordnen, wurden translationelle *lacZ*-Fusionen mit unterschiedlichen Bereichen des Operons und der Sequenzen stromaufwärts von *rpoN* generiert.



**Abb. 4.29.:** Reporterfusionen zur Untersuchung der Expression des *rpoN*-Operons in *E. coli*

(A) Schematische Darstellung des *rpoN*-Operons in *E. coli*. rechtwinklige Pfeile symbolisieren Promotoren, das Haarnadel-Symbol den Terminator des Operons. Die Klammern unter der Abbildung markieren die an *lacZ* fusionierten Bereiche.

(B) Schematische Darstellung der  $[lptA-rpoN-lacZ]$ -,  $[lptB-rpoN-lacZ]$ - und  $[lptB-yhbJ-lacZ]$ -Reporterfusion.

Die  $[lptA-rpoN-lacZ]$ -Reporterfusion (pBGG165) umfasst die beiden Promotoren des *lptAB*-Operons sowie den Promotor vor *rpoN* umfasst (*lptA* (-152) bis *rpoN* (+79)) und dient der Bestimmung der Gesamtexpression des *rpoN*-Operons

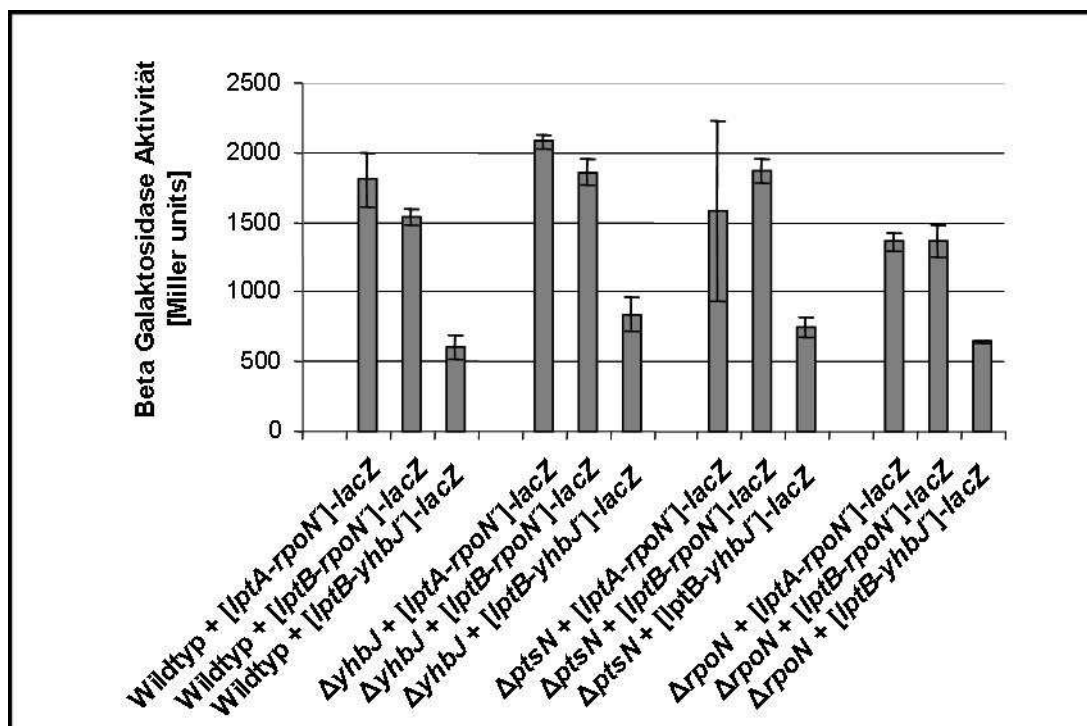
Um die Stärke des Promotors vor *rpoN* zu bestimmen, wurde in der [*lptB-rpoN*]-*lacZ*-Reporterfusion (pBGG166) der Bereich direkt stromaufwärts von *rpoN* (*lptB* (+100) bis *rpoN* (+79)) an *lacZ* fusioniert

Das letzte Konstrukt, die [*lptB-yhbJ*]-*lacZ*-Reporterfusion (pBGG168), trägt eine den gesamten Bereich zwischen den Sequenzen direkt stromaufwärts von *rpoN* bis zum 5'-Bereich von *yhbJ* an *lacZ* fusioniert und umfasst somit neben dem Promotor vor *rpoN* auch den zuvor beschriebenen intergenischen Bereich zwischen *hpf* und *ptsN* (*lptB* (+100) bis *yhbJ* (+168)). Mit dieser Fusion kann untersucht werden, ob die Sequenz stromabwärts vom *rpoN*-Promotor einen Einfluß auf die Transkription oder Translation von *yhbJ* hat.

Zur Untersuchung der *rpoN*-Expression wurde der Wildtyp R1279 sowie die Stämme  $\Delta yhbJ$  (Z37),  $\Delta ptsN$  (Z79) und  $\Delta rpoN$  (Z184) mit Plasmiden transformiert, die die in Abb. 4.29.B beschriebenen Reporterfusionen trugen (siehe 3.3.3.). Die Transformanten wurden in LB-Medium bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert und anschließend  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessungen durchgeführt (siehe 3.3.4.). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 4.30. dargestellt. In allen Stämmen zeigt sich nur ein schwacher Unterschied zwischen der [*lptA-rpoN*]- und der [*lptB-rpoN*]-*lacZ*-Reporterfusion (siehe Abb. 4.30.). Dies weist darauf hin, dass die Promotoren des *lptAB*-Operons unter diesen Bedingungen keinen signifikanten Einfluß auf die Expression des *rpoN*-Operons haben und diese größtenteils vom *rpoN*-Promotor ausgeht.

Im Gegensatz hierzu weist die Aktivität der [*lptB-yhbJ*]-*lacZ*-Reporterfusion eine um einen Faktor von 2,5 geringere Aktivität gegenüber dem der [*lptB-rpoN*]-*lacZ*-Fusion auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ein zusätzliches regulatorisches Ereignis stromabwärts des *rpoN*-Promotors stattfindet.

In den Stämmen  $\Delta yhbJ$  (Z37),  $\Delta ptsN$  (Z79) und  $\Delta rpoN$  (Z184) ist das Verhalten der *lacZ*-Reporterfusionen nicht von den Messwerten im Wildtyp unterscheidbar. Dies lässt den Schluß zu, dass YhbJ und EIIA<sup>Ntr</sup> nicht an der Regulation des *rpoN*-Operons beteiligt sind. Auch eine Autoregulation der *ptsN*- beziehungsweise *yhbJ*-Expression kann ausgeschlossen werden. Zudem zeigen diese Messungen, dass die Expression des *rpoN*-Operons weder direkt noch indirekt von der Anwesenheit des durch *rpoN* kodierten alternativen  $\sigma$ -Faktor  $\sigma^{54}$  abhängig ist.



**Abb. 4.30.:  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitätsmessung zur Expression des *rpoN*-Operons.**

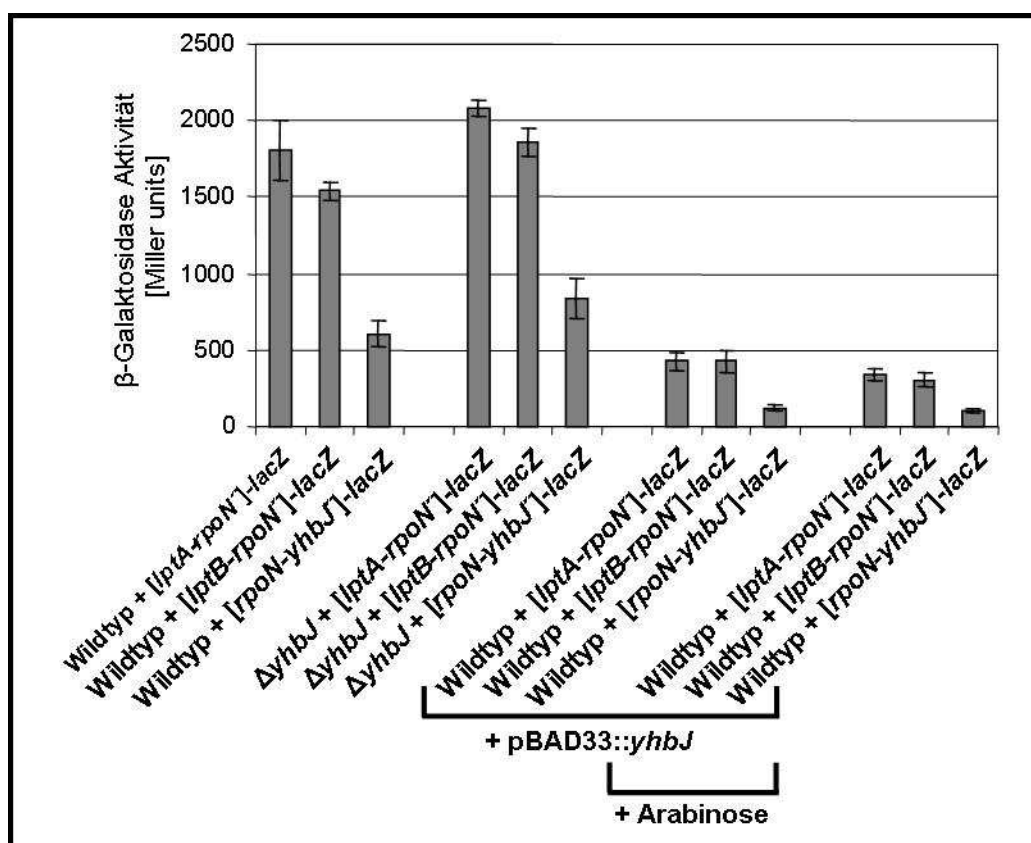
Der Wildtyp R1279 sowie die Stämme  $\Delta yhbJ$  (Z37),  $\Delta ptsN$  (Z79) und  $\Delta rpoN$  (Z184) wurden mit Plasmiden transformiert, die die Reporterfusionen [*lptA-rpoN*]-*lacZ* (pBGG165), [*lptB-rpoN*]-*lacZ* (pBGG166) und [*lptB-yhbJ*]-*lacZ* (pBGG168) tragen. Die Transformanten wurden in LB-Medium inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurde die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität wie unter 3.3.4. beschrieben bestimmt.

Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Stämmen erkennbar.

Um einen Einfluß von YhbJ auf seine eigene Expression auszuschließen, wurde die Aktivität der [*lptA-rpoN*]-*lacZ*-, [*lptB-rpoN*]-*lacZ*- und [*lptB-yhbJ*]-*lacZ*-Reporterfusion zusätzlich bei *yhbJ* -Überexpression von einem Plasmid aus (pBGG119, pBAD33::*yhbJ*) untersucht. Die Messwerte sind in Abbildung 4.31. dargestellt.

Die Anwesenheit des *yhbJ*-kodierenden Plasmides führt zu einer erniedrigten Aktivität der Reporterfusionen (Faktor 5, beispielsweise [*lptA-rpoN*]-*lacZ* in R1279 = 1805 Miller units, [*lptA-rpoN*]-*lacZ* in R1279 mit pBAD33::*yhbJ* = 342 Miller units), jedoch ist das Verhältnis der Aktivität von [*lptA-rpoN*]-*lacZ*-, [*lptB-rpoN*]-*lacZ*- und [*lptB-yhbJ*]-*lacZ*-Reporterfusion zueinander dasselbe wie im Wildtyp (3:2,5:1). Zusätzlich hat die Induktion der Expression von *yhbJ* durch L-Arabinose keinen Effekt auf die Reporteraktivität.

Somit kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass YhbJ keinerlei direkten oder indirekten Einfluß auf die Expression des *rpoN*-Operons hat



**Abb. 4.31.: β-Galaktosidase Aktivitätsmessung zum Einfluß von YhbJ auf die Expression des *rpoN*-Operons.**

Der Wildtyp (R1279), und ein  $\Delta yhbJ$ -Stamm (Z37), sowie der Wildtyp transformiert mit einem Plasmid, das *yhbJ* unter  $P_{ara}$ -Kontrolle kodiert (pBGG119) wurden mit den Plasmiden transformiert, die die [lptA-rpoN]-lacZ-, [lptB-rpoN]-lacZ- und [lptB-yhbJ]-lacZ-Reporterfusion tragen. Die Transformanten wurden in LB-Mediumn inkubiert, bis sie eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreichten und die β-Galaktosidase Aktivität wie unter 2.3.4. beschrieben bestimmt.

Obwohl die Anwesenheit des *yhbJ*-kodierenden Plasmids die Aktivität der Reporterfusionen um den Faktor 5 erniedrigt, bleibt das Verhältnis der drei Reporterfusionen zueinander gleich (3:2,5:1). Zusätzlich hat die Induktion der *yhbJ*-Expression durch Arabinose keinen Effekt auf die Reporteraktivität.

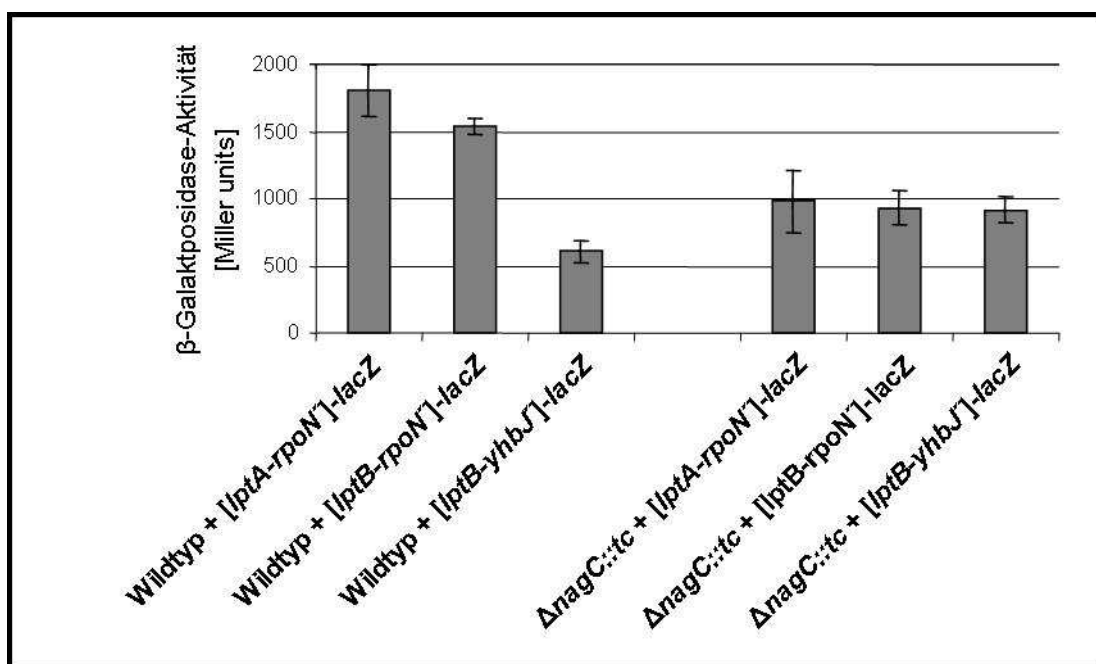
Die Anwesenheit des *yhbJ*-kodierenden Plasmides führt zu einer erniedrigten Aktivität der Reporterfusionen (Faktor 5, beispielsweise [lptA-rpoN]-lacZ in R1279 = 1805 Miller units, [lptA-rpoN]-lacZ in R1279 mit pBAD33::yhbJ = 342 Miller units), jedoch ist das Verhältnis der Aktivität der [lptA-rpoN]-, [lptB-rpoN]- und [lptB-yhbJ]-lacZ-Reporterfusionen zueinander dasselbe wie im Wildtyp (3:2,5:1). Zusätzlich hat die Induktion der Expression von *yhbJ* durch L-Arabinose keinen Effekt auf die Reporteraktivität.

Somit kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass YhbJ keinerlei direkten oder indirekten Einfluß auf die Expression des *rpoN*-Operons hat

4.5.2. Einfluß des Aminosucker-Metabolismus auf die Expression des *rpoN*-Operons

Um die Funktion des potenziellen NagC-Bindemotives im 5'-Bereich des intergenischen Bereiches zwischen *hpf* und *ptsN* zu untersuchen, wurde die Aktivität der [*lptA-rpoN*]-, [*lptB-rpoN*]- und [*lptB-yhbJ*]-*lacZ*-Reporterfusionen (vergleiche 4.5.1.) in einem Stamm bestimmt, der eine *nagC::tc*-Deletion trägt (Z12, siehe Tab. 7.1.). NagC ist der zentrale transkriptionelle Regulator des Aminosucker-Stoffwechsels in *E. coli* (siehe 2.3.3.). Die Bindung des Regulators an spezifische DNA-Motive ist gut untersucht und beschrieben (El Qaidi *et al.* 2008). Solange kein externer Aminosucker verfügbar ist, kann das Protein als Dimer an A/T-reiche DNA-Sequenzen binden, die ein konserviertes TT-x<sub>9</sub>-AA beinhalten. Sollte ein entsprechendes Aminosucker-Metabolit verfügbar werden, so wird dieser zu GlcNAc-6-P umgesetzt, welches mit NagC interagiert. Dadurch verliert NagC sowohl die Fähigkeit zur Dimerisierung als auch zur Bindung seiner Operatorsequenzen auf der DNA.

Die Aktivität der [*lptA-rpoN*]-*lacZ*-, [*lptB-rpoN*]-*lacZ*- und [*lptB-yhbJ*]-*lacZ*-Reporterfusion ist in Abb. 4.32. dargestellt.



**Abb. 4.32.: β-Galaktosidase Aktivitätsmessung zum Einfluß von NagC auf die Expression des *rpoN*-Operons.**

Der Wildtyp R1279 sowie ein Δ*nagC::tc*-Stamm (Z12) wurden mit Plasmiden transformiert, die die [*lptA-rpoN*]-, [*lptB-rpoN*]- und [*lptB-yhbJ*]-*lacZ*-Reporterfusionen tragen (pBGG165, pBGG166 und pBGG168). Die Transformanten wurden in LB-Medium inkubiert, die eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde und anschließend die β-Galaktosidase Aktivität wie unter 3.3.4. beschrieben bestimmt.

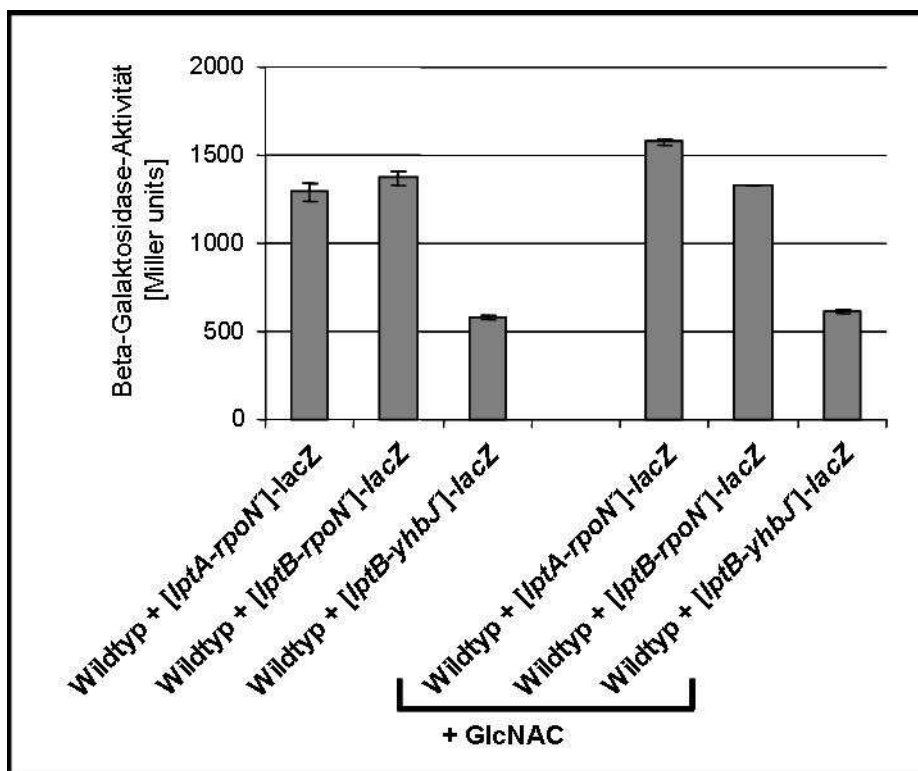
Im Gegensatz zum Wildtyp R1279 weist der Δ*nagC::tc*-Stamm für alle drei Reporterfusionen eine vergleichbare Aktivität auf.

Im Wildtypstamm R1279 wurde, wie schon in Abb. 4.30. gezeigt., bei Verwendung der [*lptA-rpoN*]- und [*lptB-rpoN*]-*lacZ*-Reporterfusionen eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von 1500 und 1800 Miller units gemessen, während die Aktivität bei Verwendung der [*lptB-yhbJ*]-*lacZ*-Reporterfusion nur 600 Miller units beträgt.

In dem *nagC::tc*-Deletionsstamm (Z12) hingegen ergab eine Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bei allen drei Reporterfusionen Werte zwischen 900 und 1000 Miller units. Somit ist die Aktivität der [*lptA-rpoN*]- und [*lptB-rpoN*]-*lacZ*-Reporterfusionen (pBGG165 und pBGG166), die die Aktivität des *rpoN*-Promotors widerspiegeln, um einen Faktor von 1,5 erniedrigt, während die Aktivität der [*lptB-yhbJ*]-*lacZ*-Fusion (pBGG168) um denselben Faktor von 1,5 erhöht ist.

Interessanterweise können diese Ergebnisse so gedeutet werden, dass NagC einen leichten aktivierenden Einfluß auf den *rpoN*-Promotor besitzt, während es gleichzeitig einen gleichstarken reprimierenden Einfluß auf die Expression stromabwärts gelegener Gene nimmt. Diese Theorie weist Ähnlichkeit zur Beeinflussung der beiden Promotoren vor *glmU* durch NagC auf: Hier führt die Bindung von NagC an die DNA im Bereich stromaufwärts des *glmU*-Startcodons zu einer Aktivierung des Promotors P1 bei gleichzeitiger schwacher Repression des dahinterliegenden Promotors P2 (vergleiche 2.3.3.).

Um einen möglichen Einfluß von NagC weiter zu untersuchen, wurden die Aktivitäten der [*lptA-rpoN*]-, [*lptB-rpoN*]- und [*lptB-yhbJ*]-*lacZ*-Reporterfusion im Wildtyp R1279 in Anwesenheit von 1% (w/v) GlcNAc im Medium bestimmt. Durch die Zugabe einer externen Aminozucker-Quelle verliert NagC wie zuvor beschrieben seine Fähigkeit zur Bindung an die DNA. Demnach sollten die Ergebnisse dieser Messungen die Ergebnisse der Messung in der *nagC::tc*-Deletion widerspiegeln. Die Aktivität der Reporterfusionen unter diesen Bedingungen ist in Abb. 4.33. dargestellt.



**Abb.4.33.:  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitätsmessung zum Einfluß von GlcNAc auf die Expression des *rpoN*-Operons.**

Der Wildtyp R1279 sowie ein  $\Delta nagC::tc$ -Stamm (Z12) wurden mit Plasmiden transformiert, die die [lptA-rpoN]-, [lptB-rpoN]- und [lptB-yhbJ]-lacZ-Reporterfusionen tragen (pBGG165, pBGG166 und pBGG168). Die Transformanten wurden in LB-Medium sowie in LB-Medium mit 1% (w/v) GlcNAc inkubiert, die eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde und anschließend die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität wie unter 2.3.4. beschrieben bestimmt.

Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Inkubation mit oder ohne 1% (w/v) GlcNAc erkennbar.

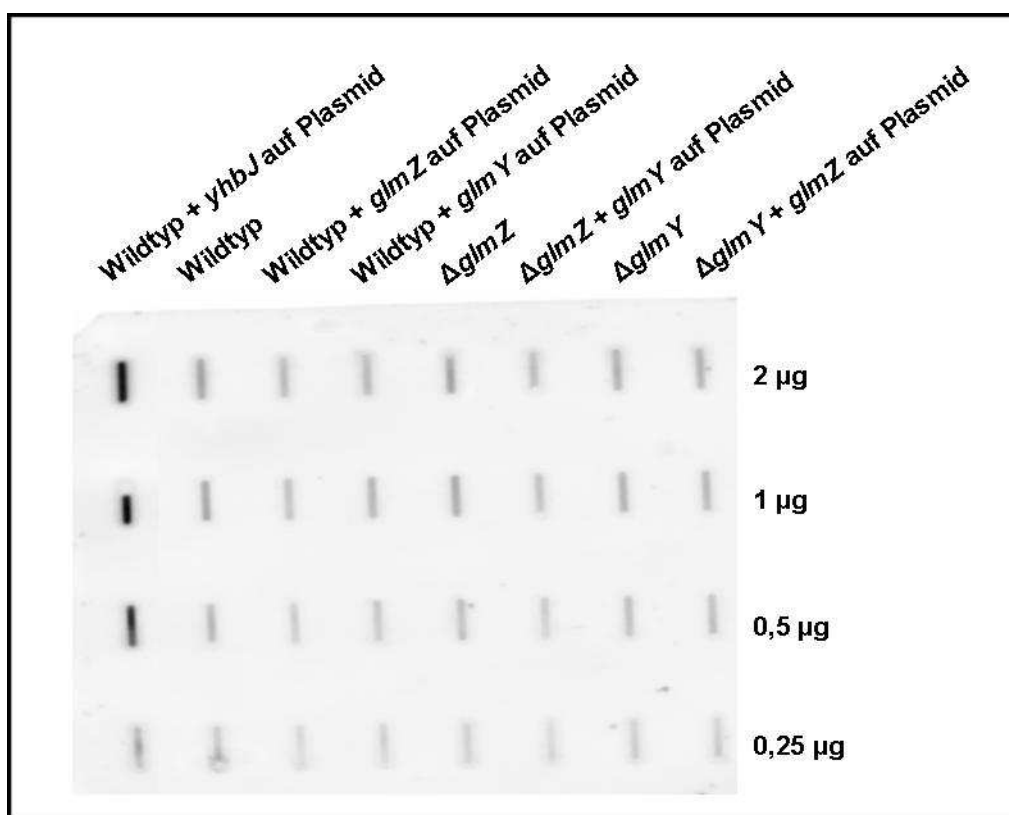
Wie klar erkennbar ist, verhalten sich die drei Reporterfusionen in Anwesenheit von 1% (w/v) GlcNAc im Medium genau so wie ohne Zugabe einer externen Aminozuckerquelle. Dies widerspricht den in Abb. 4.32. dargestellten Ergebnissen der Aktivitätsbestimmung in einer  $\Delta nagC::tc$ -Deletion. Da jedoch die Anwesenheit von GlcNAc im Medium die DNA-Bindfähigkeit von NagC aufhebt und somit einen ähnlichen Effekt wie die Deletion von *nagC* auf das Expressionsmuster haben sollte, ist es möglich, dass der in Abb. 4.32. beschriebene Effekt ein stammspezifisches Artefakt für diese Deletion ist.

Somit konnte kein Einfluß von Aminozuckern auf die Expression des *rpoN*-Operons nachgewiesen werden.



4.5.3. Einfluß von GlmY und GlmZ auf die Expression des *rpoN*-Operons

Parallel zu dieser Arbeit wurde eine zweite sRNA identifiziert, die an der Regulation der glmS-spezifischen Expression beteiligt ist, GlmY (Reichenbach *et al.* 2008; Urban und Vogel 2008). Es wurden einige Beispiele für kleine RNAs mit multiplen Zielgenen beschrieben (Guillier *et al.* 2006), weshalb als nächstes ein möglicher Einfluß der beiden kleinen RNAs auf die Expression des *rpoN*-Operons untersucht wurde. Ein möglicher Mechanismus wäre, dass YhbJ über die Beeinflussung der Aktivität von GlmZ oder GlmY seine eigene Aktivität beeinflusst.



**Abb.4.34.:** Slot Blot Analyse des Einflusses von GlmY und GlmZ auf die Expression von *yhbJ*

Der Wildtyp R1279 sowie die Stämme  $\Delta glmZ$  (Z45) und  $\Delta glmY$  (Z96) und Transformanten des Wildtyps mit einem Plasmid, das *yhbJ* unter  $P_{tac}$ -Kontrolle trägt (pBGG119, Positivkontrolle), einem Plasmid mit *glmY* unter  $\lambda P_L$ -Kontrolle (pBGG149) und einem Plasmid mit *glmZ* unter  $P_{ara}$ -Kontrolle (pBGG84) sowie der Deletionsstämmen mit Plasmiden, die die jeweils andere sRNA trugen, wurden in LB-Medium unter Induktion mit 1 mM IPTG beziehungsweise 0,2% L-Arabinose inkubiert, bis sie eine  $OD_{600}$  von 1 erreichten. Gesamt-RNA wurde wie unter 3.6.1. beschrieben präpariert und anschließend in einem Slot Blot unter Verwendung einer DIG-markierten Sonde gegen *yhbJ* analysiert (siehe 3.6.8.).

Weder die Deletion noch die Überexpression einer der kleinen RNAs hat einen Effekt auf die Transkriptmenge von *yhbJ*.

Hierzu wurde der Einfluss von Deletionen als auch der Überexpression der zu den beiden kleinen RNAs korrespondierenden Gene *glmZ* und *glmY* auf die Menge des *yhbJ*-enthaltenden Transkriptes mittels Northern Blot Analyse untersucht.

Der Wildtyp R1279 sowie die Stämme  $\Delta glmZ$  (Z45) und  $\Delta glmY$  (Z96) und Transformanten des Wildtyps mit einem Plasmid, das *yhbJ* unter  $P_{tac}$ -Kontrolle trägt (pBGG119, Positivkontrolle), einem Plasmid mit *glmY* unter  $\lambda P_L$ -Kontrolle (pBGG149) und einem Plasmid mit *glmZ* unter  $P_{ara}$ -Kontrolle (pBGG84) sowie  $\Delta glmZ$  mit einem Plasmid mit *glmY* unter  $\lambda P_L$ -Kontrolle Plasmiden und  $\Delta glmY$  *glmZ* unter  $P_{ara}$ -Kontrolle, wurden in LB-Medium unter Induktion mit 1 mM IPTG beziehungsweise 0,2% L-Arabinose inkubiert, bis sie eine  $OD_{600}$  von 1 erreichten. Gesamt-RNA wurde wie unter 3.6.1. beschrieben präpariert und anschließend in einem Slot Blot unter Verwendung einer DIG-markierten Sonde gegen *yhbJ* analysiert (siehe 3.6.8.).

Wie klar zu erkennen ist, hat weder eine Deletion noch eine Überexpression einer der beiden sRNAs einen Effekt auf die detektierte Transkriptmenge.

#### 4.6. Untersuchung der Auswirkungen einer *yhbJ*-Deletion mittels MicroArray Analysen

Um einen möglichen globalen Einfluß einer *YhbJ*-Deletion auf die Genexpression zu untersuchen, wurden MicroArray Analysen durchgeführt. Hierzu wurde Gesamt-RNA der Stämme JVS-140 (Wildtyp) und JVS-8018 ( $\Delta yhbJ$ ) wie unter 3.6.12. beschrieben präpariert und mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert. Die MicroArrays wurden dann in der MicroArray Core Facility des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie, Berlin, durchgeführt und durch Kai Papenfort, AG RNA-Biologie des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie, Berlin, ausgewertet. Das Experiment wurde mit sogenannten „Dye-swap“ durchgeführt, das heißt, dass die RNA jedes Stammes sowohl mit Cy3 als auch mit Cy5 markiert und gegeneinander abgeglichen wurden, um eventuelle Unterschiede in der Markierungseffizienz auszuschließen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.3. (erhöhte Expression) und 4.4. (verringerte Expression) aufgeführt, wobei nur Gene berücksichtigt wurden, deren Expression mindestens um einen Faktor von 2,5 verändert war.

**Tabelle 4.3.: Gene, deren Expression in einem *yhbJ*-Deletionsstamm erhöht ist**

Sequenz-ID	Faktor	Genname	Beschreibung
1555628	85,01	<i>ibpA</i>	Kleines Hitzeschockprotein IbpA, bindet aggregierte Proteine
1555629	61,11	<i>ibpB</i>	Kleines Hitzeschockprotein IbpB bindet aggregierte Proteine

## Ergebnisse

---

1554953	25,82	<i>pyrB</i>	Katalytische Untereinheit der Aspartat-Carbamoyltransferase
1554960	20,20	<i>pyrI</i>	Regulatorische Untereinheit der Aspartat-Carbamoyltransferase
1555678	12,25	<i>glmS</i>	Glukosamin-6-Phosphat-Synthase
1556250	11,90	<i>carA</i>	Untereinheit der Carbamoyl-Phosphat-Synthase
1555315	11,69	<i>mopA</i>	Untereinheit des GroEL-Chaperones
1555572	10,88	<i>hsIV</i>	Untereinheit der ATPase-Komponente der HsIVU-Protease
1555911	10,08	<i>dnaK</i>	Untereinheit des DnaJ/Dank/GrpE-Chaperonkomplexes
1552813	10,01	<i>yrfG</i>	Purin-Nukleotidase der HAD-Familie
1555316	9,33	<i>mopB</i>	Untereinheit des GroES-Regulators
1554517	8,67	<i>tnaA</i>	L-Cystein Desulfhydrase / Tryptophanase
1554518	7,67	<i>tnaB</i>	Tryptophan-Transporter
1554961	7,45	<i>pyrL</i>	Attenuationskontrolle des <i>pyrLBI</i> -Operon
1554501	7,18	<i>thiG</i>	Untereinheit des ThiGH-Thiamin-Biosynthesekomplex
1555272	7,12	<i>mglA</i>	ATP-bindende Untereinheit des Galaktose ABC-Transporter
1555273	7,09	<i>mglB</i>	Periplasmatische Bindekomponente des Galaktose ABC-Transporter
1555274	6,86	<i>mglC</i>	Membranständige Untereinheit des Galaktose ABC-Transporter
1552814	6,81	<i>yrfH</i>	Hitzeschockprotein 15
1555684	6,55	<i>glnG</i>	Aktivator der $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkription
1556106	6,45	<i>cysH</i>	3'-Phospho-Adenylylsulfat-Reduktase
1557026	6,36	<i>ampD</i>	N-Acetyl-Anhydromuramyl-L-Alanin-Amidase
1556197	6,30	<i>b4140</i>	Protein der inneren Membran, Überexpression verhindert Ausschleusen des Phagen T7
1555910	6,12	<i>dnaJ</i>	Untereinheit des DnaJ/Dank/GrpE-Chaperonkomplexes
1553230	6,05	<i>yjaB</i>	Potenzielle Acetyltransferase
1552991	5,86	<i>yjcH</i>	Konserviertes Protein der inneren Membran
1555571	5,75	<i>hslU</i>	Untereinheit der ATPase-Komponente der HsIVU-Protease
1553509	5,41	<i>yhdY</i>	Bestandteil eines potenziellen ABC-Transporter für Aminosäuren
1555460	5,27	<i>lon</i>	Bestandteil der DNA-bindenden Protease La
1556248	5,25	<i>caiF</i>	Transkriptioneller Regulator des anaeroben Carnitin-Abbaus
1555858	5,02	<i>frvR</i>	Potenzieller negativer transkriptioneller Regulator eines Zucker-Phosphotransferase-Systems
1556298	4,86	<i>clpB</i>	ATP-abhängiges molekulares Chaperon
1555888	4,68	<i>fumC</i>	Klasse II Fumarase
1556985	4,54	<i>acs</i>	Acetyl-CoA-Synthetase
1554758	4,38	<i>rhaS</i>	Transkriptioneller Aktivator des Rhamnose-Abbaus
1556107	4,36	<i>cysI</i>	Flavi-Reduktase
1555504	4,22	<i>mcrC</i>	Untereinheit des 5-Methylcytosin-Restriktionssystem
1555139	4,07	<i>ndk</i>	Multifunktionelle Nukleosid-Diphosphat-Kinase
1553071	4,05	<i>yjhH</i>	Potenzielle Lyase/Synthase
1556086	4,03	<i>cycA</i>	Glycin/Serin/Alanin-APC-Transporter
1554111	4,00	<i>ybeY</i>	Protein mit Ähnlichkeit zu Metall-abhängigen Hydrolasen
1556102	3,90	<i>cysC</i>	Adenylylsulfat-Kinase
1555386	3,79	<i>inaA-r</i>	pH-induziertes Protein der Stressantwort
1554955	3,77	<i>pyrD</i>	Dihydroorotat-Oxidase
1552990	3,63	<i>yjcG</i>	Acetat/Glycolat-Permease der SSS-Familie
1554460	3,59	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA-Synthetase
1556218	3,54	<i>bgIF</i>	Enzym IIABC des kryptischen $\beta$ -Glucosid-PTS-Transporter.
1552815	3,53	<i>yrfI</i>	Hitzeschockprotein 33
1555250	3,48	<i>menA</i>	1,4-dihydroxy-2-naphthoat-Octaprenyltransferase
1554112	3,45	<i>ybeZ</i>	Protein mit potenzieller NTP-Hydrolase-Domäne

## Ergebnisse

1553798	3,40	<i>ycjX</i>	Konserviertes Protein
1555009	3,37	<i>oppA</i>	ATP-abhängiger Oligopeptid-Transporter der ABC-Superfamilie
1554339	3,37	<i>upp</i>	Uracil-Phosphoribosyltransferase
1555685	3,34	<i>glnH</i>	Hoch-affiner Glutamin-Transporter der ABC-Superfamilie
1553184	3,29	<i>yigU</i>	Untereinheit des Tat ( <i>twin-arginine translocation</i> ) –Komplexes
1554319	3,25	<i>udhA</i>	Lösliche Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase
1556070	3,25	<i>cspE</i>	multifunktionelles Protein der Kälteschock-Familie
1553892	3,25	<i>yeaD</i>	Konserviertes Protein
1553988	3,19	<i>yceP</i>	Regulator der Biofilmbildung
1556347	3,12	<i>iscR</i>	Negativer Regulator der <i>iscRSUA</i> -Expression
1555744	3,12	<i>grpE</i>	Untereinheit des DnaJ/Dnak/GrpE-Chaperonkomplexes
1556874	3,11	<i>artP</i>	Untereinheit eines Arginin-Transporter der ABC-Superfamilie
1556193	3,08	<i>cpxP</i>	Negativer Regulator der Cpx-Antwort auf extracytoplasmatische Stress
1556108	3,06	<i>cysJ</i>	Untereinheit des Sulfid-Reduktase Flavoproteins
1555240	3,06	<i>mdh</i>	Malat-Dehydrogenase
1555576	3,00	<i>htrA</i>	Untereinheit der periplasmatischen Protease Do (DegP)
1555505	2,99	<i>mcrD</i>	konserviertes Protein
1554435	2,98	<i>yadD</i>	Potenzielle Transposase
1557015	2,97	<i>aldA</i>	Aldehyd-Dehydrogenase A
1555909	2,96	<i>dnaG</i>	DNA-Primase, katalysiert die Synthese von RNA-Primern an einzelsträngiger DNA
1554070	2,94	<i>ybcU</i>	Homolog des Bor-Proteins des Bacteriophagen lambda
1555263	2,94	<i>metF</i>	5,10-Methylenetetrahydrofolat-Reductase
1556194	2,92	<i>b3914</i>	Unbekannt
1555241	2,92	<i>mdh-r</i>	Malat-Dehydrogenase
1556987	2,90	<i>add</i>	Deoxyadenosin-Deaminase / Adenosin-Deaminase
1553148	2,87	<i>yidY</i>	Mitglied der " <i>major facilitator superfamily</i> " (MFS)
1555287	2,87	<i>miaA</i>	δ(2)-Isopentenylpyrophosphat-tRNA-Adenosin-Transferase
1553958	2,87	<i>hspQ</i>	Hitzeschockprotein
1553731	2,85	<i>yeiC</i>	Pseudouridin-Kinase
1556779	2,84	<i>b1397</i>	β-ketoadipyl-CoA-Thiolase des Phenylacetat-Katabolismus
1555432	2,80	<i>ldhA</i>	D-lactate-Dehydrogenase
1553285	2,79	<i>yhgl</i>	Gerüstprotein für Eisen-Schwefel-Cluster
1556045	2,78	<i>corA</i>	Magnesium-Ionen-Transporter, Mitglied der " <i>Metal Ion Transporter</i> " (MIT)-Familie
1554340	2,76	<i>uraA</i>	Potenzieller hoch-affiner Uracil-Transporter
1553201	2,76	<i>yihR</i>	Potenzielle Aldose-1-Epimerase, involviert in Biofilmbildung
1554950	2,76	<i>putP</i>	Mitglied der SSS-Transporterfamilie
1555086	2,75	<i>phnO</i>	potenzielle Acyltransferase mit Acyl-CoA-N-Acyltransferase-Domäne
1553165	2,74	<i>yifE</i>	konserviertes Protein
1553097	2,59	<i>yjiU</i>	konserviertes Protein
1554110	2,58	<i>ybeX</i>	Potenzieller Ionentransporter
1554484	2,52	<i>tdcD</i>	Protein mit Propionat- und Acetat-Kinaseaktivität
1554956	2,50	<i>pyrE</i>	Orotat-Phosphoribosyltransferase
1555164	2,50	<i>nmpC</i>	Mitglied der " <i>General Bacterial Porin</i> " (GBP)-Familie

Sequenz-ID= Identifikationsnummer des korrespondierenden Spots auf dem Chip, Faktor= Faktor der Regulation.

Erwartungsgemäß findet sich hier das Gen *glmS* mit einer der am stärksten erhöhten Expressionen gegenüber dem Wildtyp (Faktor 12), den höchsten Effekt hat eine Deletion von *yhbJ* auf die Expression der Gene *ibpAB*, deren Expression um einen Faktor von 85 beziehungsweise 61 gegenüber dem Wildtyp erhöht ist. Diese Gene kodieren Proteine, die mit der Hitzeschockantwort und der Bildung von sogenannten „inclusion bodies“ assoziiert sind (Laskowska *et al.* 1996b). In Tabelle 4.3. findet sich eine Vielzahl weiterer Chaperon- und Protease-kodierende Operone, die in die Antwort auf die Akkumulation fehlgefalteter Proteine, in die Hitzeschockantwort oder andere Stressantworten involviert sind: *mopAB* (Taguchi 2005), *hslUV* (Goldberg *et al.* 1997), *dnaJK* (Bukau und Horwich 1998), *yrfIH* (Graf und Jakob 2002), *lon* (Nishii *et al.* 2005), *clpB* (Mogk und Bukau 2004), *inaA* (White *et al.* 1992), *grpE* (Bukau und Horwich 1998), *htrA* (Seol *et al.* 1991), *cpxP* (Danese und Silhavy 1998) und *hspQ* (Shimuta *et al.* 2004).

Die Expression von *ibpAB* wird während der Biofilmbildung erhöht (Ren *et al.* 2004), ebenso wie die Expression von *cpxP*. Mit *yceP* ist in der Liste der hochregulierten Gene auch ein Regulator der Biofilm-Bildung enthalten (Beloin *et al.* 2004; Domka *et al.* 2006) sowie mit *yihR* ein weiteres Gen, das in die Biofilm-Bildung involviert ist (Herzberg *et al.* 2006).

Die Deletion von *yhbJ* hat ebenfalls einen starken Einfluß auf die Expression der Gene *pyrB* und *pyrI*. Das Gen *pyrB* (25fach erhöht) kodiert für die katalytische Untereinheit der Aspartat-Carbamoyltransferase, während das Genprodukt PyrI (20fach erhöht) für die regulatorische Untereinheit desselben Enzyms kodiert (Neidhardt *et al.* 1996). Die Aspartat-Carbamoyltransferase ist Teil der Pyrimidinsynthese und somit der UMP-Biosynthese. Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang das Gen *pyrL*, das die Attenuation des gemeinsamen *pyrLBI*-Operons kontrolliert (Levin und Schachman 1985) und dessen Expression in der *yhbJ*-Deletion ebenfalls um einen Faktor von 7,5 erhöht ist. Desweiteren sei auch auf das Gen *carA* verwiesen, dessen Genprodukt ebenfalls an der Carbamoyl-Synthese beteiligt ist (Thoden *et al.* 1999), und dessen Expression in einem  $\Delta yhbJ$ -Hintergrund um einen Faktor von 12 erhöht ist.

Die Gene *mglABC* kodieren für einen Galaktose-ABC-Transporter (Wu und Mandrand-Berthelot 1995) und werden alle in einem *yhbJ*-Deletionshintergrund um einen Faktor von 7 verstärkt exprimiert. In Tabelle 4.3. sind einige weitere Bestandteile oder

vermutete Bestandteile von Transportkomplexen enthalten: *yhdY* (Saurin *et al.* 1999), *tnaB* (Edwards und Yudkin 1982), *cycA* (Robbins und Oxender 1973), *yjcG* (Gimenez *et al.* 2003), *bglF* (Schnetz *et al.* 1987), *oppA* (Pearce *et al.* 1992), *glnH* (Wu und Mandrand-Berthelot 1995), *artP* (Linton und Higgins 1998), *corA* (Smith *et al.* 1993), *putP* (Reizer *et al.* 1994b), *ybeX* (GOA 2000) und *nmpC* (Zhai und Saier 2002).

Auffällig in diesem Zusammenhang ist, dass sechs dieser Genen für Bestandteile von Aminosäure-Transportern (*tnaB*, *yhdY*, *cycA*, *glnH*, *artP*) oder Oligopeptide (*oppA*) kodieren.

Weiterhin beinhaltet die Liste mehrere transkriptionelle Regulatoren, namentlich *glnG*, welches für NtrC, einen Aktivator der  $\sigma^{54}$ -abhängigen Genexpression, kodiert (Shiau *et al.* 1993), sowie *caiF* (Eichler *et al.* 1996), *frvR* (Reizer *et al.* 1994a), *rhaS* (Moralejo *et al.* 1993), *iscR* (Schwartz *et al.* 2001) und *cpxP* (Raivio *et al.* 1999).

**Tabelle 4.4.: Gene, deren Expression in einem *yhbJ*-Deletionsstamm erniedrigt ist**

Sequenz-ID	Faktor	Genname	Beschreibung
1556067	-15,31	<i>cspA</i>	RNA-Chaperon, verhindert Bildung von Sekundärstrukturen bei niedrigen Temperaturen
1553461	-8,28	<i>yhbJ</i>	P-Loop-enhaltendes Protein
1554739	-4,74	<i>rfaK</i>	Heptosyl-Transferase IV, involviert in die Lipopolysaccharid-Kernbiosynthese
1554481	-3,98	<i>tdcA</i>	Regulator der LysR-Familie, kontrolliert Gene des Aminosäurekatabolismus
1555519	-3,68	<i>hepA</i>	Transkriptioneller Aktivator, der die Recyclingrate der RNA-Polymerase erhöht
1553463	-3,63	<i>yhbM</i>	Lipoprotein, involviert in Zellteilung
1553442	-3,56	<i>yhaF</i>	$\alpha$ -Dehydro- $\beta$ -Deoxy-D-Glucarat-Aldolase
1556971	-3,47	<i>aceF</i>	Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase
1553455	-3,45	<i>yhaU</i>	Uncharakterisiertes Mitglied der "major facilitator superfamily" (MFS)
1554745	-3,38	<i>rfaZ</i>	Protein involviert in die Lipopolysaccharid-Kernbiosynthese
1556476	-3,25	<i>b2001</i>	Potenzielles Membranprotein des Prophagen CP4-44
1553809	-3,22	<i>ydaR</i>	Potenzieller DNA-bindender transkriptioneller Regulator
1554935	-3,19	<i>purA</i>	Adenylosuccinat-Synthetase
1554364	-3,19	<i>wbbK</i>	Protein potenziell involviert in die Lipopolysaccharid-Biosynthese
1555249	-3,15	<i>melR</i>	Transkriptioneller Aktivator
1554027	-2,99	<i>yehH</i>	Potenzielles Protein der inneren Membran
1554440	-2,96	<i>yadI</i>	Enzym IIA-Domäne des potenziellen N-acetylgalactosamin-PTS
1554744	-2,86	<i>rfaY</i>	Protein der Lipopolysaccharid-Kernbiosynthese
1553443	-2,84	<i>yhaG</i>	Galactaratdehydratase
1554012	-2,80	<i>yceE</i>	potenzieller DNA-bindender transcriptioneller Regulator
1555109	-2,74	<i>pmrD</i>	Protein der Polymyxin B Resistenz
1554615	-2,67	<i>ruvC</i>	Untereinheit des RuvABC-Komplex der Rekombination
1555183	-2,66	<i>ntpA</i>	Dihydroneopterin-Triphosphat-Pyrophosphohydrolase (DHNTase)
1552948	-2,65	<i>yojL</i>	potenzielles Lipoprotein der Thiaminbiosynthese
1555255	-2,63	<i>menF</i>	Isochorismat-Synthase 2
1554617	-2,61	<i>sapA</i>	Untereinheit eines Mitgliedes der ABC-Transporter-Superfamilie
1554422	-2,57	<i>yabO</i>	Pseudouridin-Synthase

## Ergebnisse

---

1556989	-2,57	<i>adhE</i>	PFL-Deaktivase / Alkoholdehydrogenase / Acetaldehyd-Dehydrogenase
1555167	-2,56	<i>nrdA</i>	B1 Protein der Ribonukleosid-Diphosphat Reduktase
1553194	-2,53	<i>yihK</i>	Protein potenziell involviert in die Lipopolysaccharid-Biosynthese und in Wirtskolonisation
1552841	-2,52	<i>yjjP</i>	potenzielles Strukturprotein der inneren Membran
1554847	-2,50	<i>rpsC</i>	S3-Protein der ribosomalen 30S Untereinheit

Sequenz-ID= Identifikationsnummer des korrespondierenden Spots auf dem Chip, Faktor= Faktor der Regulation (negative Werte geben Erniedrigung an).

Unter den Genen, deren Expression in einem  $\Delta yhbJ$ -Stamm stark verringert ist, weist *cspA* den höchsten Effekt auf (Faktor 15). Das korrespondierende Genprodukt ist ein RNA-Chaperon, das die Bildung von Sekundärstrukturen bei niedrigen Temperaturen verhindert (Jiang *et al.* 1997).

Um einen hohen Faktor von 4,7 ist ebenfalls die Expression von *rfaK* erniedrigt, dessen Genprodukt an der Lipopolysaccharid-Kern-Biosynthese beteiligt ist (Heinrichs *et al.* 1998), ebenso zudem finden sich mit *rfaYZ* zwei weitere Gene des *rfaQGPSBIJYZ-rfaK*-Operons in Tabelle 3.4.. Die mit diesen beiden Genen korrespondierenden Proteine sind ebenfalls am Aufbau der Lipopolysaccharide beteiligt (Yethon *et al.* 1998; Fridrich *et al.* 2003) genau wie *wbbK* (GOA *et al.* 2001) und *yihK* (Moller *et al.* 2003). Auch unter den Genen, deren Expression in Abwesenheit von *yhbJ* erniedrigt ist, finden sich solche, die für transkriptionelle Regulatoren kodieren: *tdcA* (Ganduri *et al.* 1993), *hepA* (Sukhodolets *et al.* 2001), *ydaR* (Perez-Rueda *et al.* 2004), *melR* (Belyaeva *et al.* 2000) und *ycgE* (GOA *et al.* 2001).

## **5. Diskussion**

### **5.1. Feedback-Kontrolle der *glmS*-Expression**

In *E. coli* sind die Gene *glmU* und *glmS* in einem Operon kolokalisiert, welches von den beiden NagC-kontrollierten Promotoren P1 und P2 vor *glmU* aus exprimiert wird. Während GlmU unter allen Bedingungen essentiell für die Synthese von Zellwandvorläufern, und somit für das Überleben der Zelle ist, wird die Glukosamin-6-Phosphat Synthase GlmS nur dann benötigt, wenn keine externe Quelle für Aminosucker zur Verfügung steht. Dies warf die Frage auf, wie die Zelle die Aktivität von GlmS steuert, so dass die *de novo*-Synthese von GlcN-6-P nur dann stattfindet, wenn die Zelle darauf angewiesen ist. Ohne eine derartige Kontrolle würde die konstitutive Aktivität von GlmS auch dann GlcN-6-P synthetisieren, wenn Aminosucker aufgrund eines externen Angebotes als Energiequelle genutzt werden, so dass es zu einer verschwenderischen „Kurzschluss“-Reaktion zwischen GlmS und NagB kommt (vergleiche 2.3.).

In Eukaryoten ist die enzymatische Aktivität von GlmS über eine Feedback-Inhibition durch das zentrale Intermediat stromabwärts im Syntheseweg, UDP-GlcNAc, reguliert (Milewski 2002), oder im Falle des menschlichen Homologs GFAT1, durch das direkte Produkt GlcN-6-P. Im Gram-positiven Bakterium *B. subtilis* wird die Expression von *glmS* durch ein Ribozym kontrolliert, welches in Anwesenheit des Produktes GlcN-6-P eine spezifische Spaltung der mRNA katalysiert, was in einer raschen Abbau der mRNA resultiert (Collins *et al.* 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Synthese von GlmS in *E. coli* ebenfalls einer Feedback-Regulation unterliegt, die auf der posttranskriptionellen Ebene stattfindet: Eine Verarmung von GlcN-6-P, aber keines der stromabwärts gelegenen Intermediate des Syntheseweges, induziert eine stark erhöhte Expression von *glmS*.

An dieser Regulation sind neben Hfq und RNase E vor allem YhbJ und die kleine RNA GlmZ beteiligt.

In Abwesenheit von *yhbJ* ist die *glmS*-Expression stark erhöht. Dies ist strikt abhängig von GlmZ, in einem  $\Delta$ *glmZ*-Stamm ist der Effekt aufgehoben.

Interaktion von Transkripten mit komplementärer regulatorischer RNA ist ein Modell, dass bereits 1961 als möglicher Kontrollmechanismus der Genexpression vorgeschlagen wurde (Jacob und Monod 1961). Zunächst wurden hauptsächlich *antisense*-RNAs



identifiziert, welche in *cis* mit ihren Zielgenen auf dem Gegenstrang kodiert sind und über perfekte Basenpaarung wirken (Wagner *et al.* 2002). Es dauerte bis in die 1980er Jahre, bis globale Untersuchungen der RNA einer Zelle Spezies wie Spot42 (Rice *et al.* 1987) und MicF (Aiba *et al.* 1987; Andersen *et al.* 1987) identifizierten, für die eine regulatorische Funktion gezeigt werden konnte und die in *trans* zu ihren Zielgenen kodiert sind. Im Falle von Spot42 dauerte es noch weitere 15 Jahre, bis eine biologische Rolle zugeordnet werden konnte (Moller *et al.* 2002). Die Regulation durch kleine, nicht-kodierende RNAs erfolgt meist über einen Mechanismus, in dem die RNA die Ribosomenbindestelle der Ziel-mRNA überdeckt und so die Translation verhindert (Gottesman 2004). Zusätzlich stimuliert diese Interaktion häufig die Degradation der mRNA durch RNase E (Morita *et al.* 2005).

Die posttranskriptionellen Regulation durch sRNAs ist von Prokaryoten bis hin zu Säugetieren konserviert (Bartel 2004; Gottesman 2005; Storz *et al.* 2005) und ist vornehmlich in essentielle Vorgänge wie Stressantwort in Bakterien (Gottesman 2004) und zeitlicher Steuerung der Differenzierung Pflanzen (Zhang *et al.* 2006) beteiligt.

Es wurde gezeigt, dass unter Verarmung der an GlcN-6-P oder in Abwesenheit von YhbJ die unprozessierte, aktive Form von GlmZ in der Zelle akkumuliert (Kalamorz *et al.* 2007). Die Anwesenheit der unprozessierten Form von GlmZ führt zu einer positiven Kontrolle der Genexpression. Hierbei paart ein Bereich von 15 einzelsträngigen Nukleotiden der sRNA mit dem 5'-Bereich einer Sekundärstruktur an der Ribosomenbindestelle wodurch diese aufgelöst und die Translation der *glmS*-mRNA ermöglicht wird (siehe Abb.5.1.; (Görke und Vogel 2008; Urban und Vogel 2008)). Diese Interaktion aktiviert nicht nur die Translation, sondern führt auch zu einer signifikanten Stabilisierung des *glmS*-spezifischen Transkriptes (Kalamorz *et al.* 2007; Urban und Vogel 2008). Unterstützt wird das beschriebene Modell durch den Umstand, dass nur die unprozessierte Form von GlmZ in der Lage ist, die Akkumulation des *glmS*-spezifischen Transkriptes zu vermitteln, und dass die Prozessierung der kleinen RNA fast alle an der beschriebenen potenziellen Interaktion beteiligten Basen entfernt (Urban und Vogel 2008).

Eine umgekehrte Regulation, in der ein Verdecken der Ribosomenbindestelle zu einer Destabilisation der mRNA führt, ist für verschiedene sRNAs beschrieben (Morita und Aiba 2006; Prevost *et al.* 2007).

Einige Beispiele sind bekannt, in denen sRNAs die Translation ihrer Ziel-mRNA stimulieren. Beispielsweise ist die Translation der mRNA des Gens *rpoS*, kodierend für den alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^S$ , durch eine Haarnadelstruktur an der

Ribosomenbindestelle stark eingeschränkt. Die Translation kann jedoch durch die sRNAs DsrA und RprA aktiviert werden, deren Basenpaarung mit der *rpoS*-mRNA die Ausbildung der Sekundärstruktur verhindert (Lease *et al.* 1998; Majdalani *et al.* 2002). Parallel hierzu unterliegt die Translation von *rpoS* einer negativen Kontrolle durch die sRNA OxyS (Zhang *et al.* 1998).

Die sRNA RhyB kontrolliert Gene des Eisenmetabolismus und ist eines der wenigen Beispiele für eine regulatorische RNA, die sowohl als Repressor wie auch als Aktivator der Translation wirkt. Unter Eisenlimitierung wird eine transkriptionelle Repression des Gens *rhyB* durch den Hauptregulator des Eisenmetabolismus, Fur, aufgehoben und die sRNA in großen Mengen synthetisiert. Sie bindet daraufhin an spezifische mRNAs, deren Abbau dadurch beschleunigt wird. Zusätzlich zu dieser Wirkung interagiert RhyB mit der *shiA*-mRNA und aktiviert deren Translation durch Auflösung einer inhibitorischen Sekundärstruktur (Prevost *et al.* 2007).

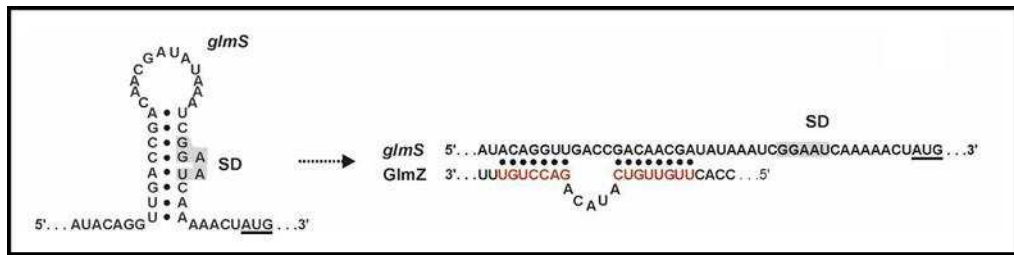
Die Interaktion von GadY mit der *gadX*-mRNA ist der einzige andere beschriebene Fall einer Stabilisierung von mRNA durch sRNA-Bindung. Untypisch ist hier jedoch die Wirkung einer sRNA durch Interaktion mit der 3'-Region der Ziel-mRNA (Opdyke *et al.* 2004). Somit stellt die Interaktion von GlmZ mit dem *glmS*-Transkriptes das erste Beispiel für die Stabilisierung der Ziel-mRNA durch Bindung einer sRNA an den nicht-translatierten 5'-Bereich (Kalamorz *et al.* 2007), siehe Abb. 5.1.).

Die Bindung einer sRNA an ihre Ziel-mRNA ist häufig abhängig von Hfq, welches den RNA:RNA-Komplex stabilisiert. Zudem vermittelt es in vielen Fällen die Degradation des Komplexes (Gottesman 2005; Aiba 2007). Auch im Falle der Kontrolle der *glmS*-Expression durch GlmZ konnte eine starke Abhängigkeit von Hfq gezeigt werden, ein weiterer Hinweis darauf, dass der Mechanismus auf der direkten Interaktion der beiden RNA-Spezies beruht. Hfq hat Homologie zum Protein Sm aus Eukaryoten und Archaea, das ebenfalls in den RNA-Metabolismus involviert ist (Wilusz und Wilusz 2005). Es bildet ringförmige Homo-Hexamere (Møller *et al.* 2002) und ist ein in großen Mengen vorkommendes Protein: In *E. coli* liegen etwa 60.000 Proteine dieser Spezies pro Zelle vor (Vassilieva *et al.* 2002). Es wurde gezeigt, dass Hfq RNA mit hoher Affinität bindet und dass das erkannte Motiv eine kurze A/U-reiche Sequenz gefolgt von einer Haarnadelstruktur ist (Mikulecky *et al.* 2004). Zusätzlich konnte eine Chaperonaktivität für Hfq gezeigt werden: Die Anwesenheit von Hfq erhöht die Bindung der sRNA DsrA an ihr Ziel *rpoS* (Arluison *et al.* 2007). Interessant sind auch Interaktionen von Hfq mit dem RNA-Polymerase-Holoenzym (Sukhodolets und Garges 2003) und mit PNP und

PAP I (Mohanty *et al.* 2004), die beide Bestandteil des Degradosoms sind, zumal PAP I ebenfalls eine Rolle in der Regulation der *glmS*-spezifischen Expression hat.

Das *glmUS*-Primärtranskript wird durch RNase E am Stopcodon von *glmU* prozessiert. Der Bereich am *glmU*-Stopcodon stimmt mit den beschriebenen Eigenschaften einer RNase E- Schnittstelle überein: Ein A/U-reicher Bereich in der Nähe einer Haarnadelstruktur (Diwa *et al.* 2000). Mutationen, die die in Frage kommenden Haarnadelstrukturen auflösen, haben keinen Einfluss auf die Aktivität der *glmS'*-*lacZ*-Reporterfusion, jedoch verringert ein Entfernen der gesamten potenziellen RNase E- Schnittstelle die Aktivität der Reporterfusion um eine Faktor von 5. Die Aktivität der Reporterfusion ist unter diesen Umständen aber noch immer abhängig von YhbJ und GlmZ. Dies unterstützt die Vorhersage, dass GlmZ durch Paarung mit der Region direkt stromaufwärts des *glmS*-Startcodons wirkt. Die Prozessierung des *glmUS*-Primärtranskriptes und die YhbJ/GlmZ-abhängige Regulation der *glmS*-spezifischen Expression sind demnach zwei unabhängige Ereignisse (Kalamorz *et al.* 2007), jedoch ist GlmZ für die Stabilisierung des *glmS*-spezifischen Transkriptes notwendig. In einem  $\Delta$ *glmZ*-Hintergrund ist YhbJ-abhängige Regulation der *glmS*-Expression ausgeschaltet.

Eine weitere sRNA, GlmY, wurde identifiziert, deren Überexpression die *glmS*-Expression aktiviert (Reichenbach *et al.* 2008; Urban und Vogel 2008). GlmY liegt in der Zelle in einer unprozessierten und einer prozessierten Form vor (Wassarman *et al.* 2001), jedoch ist prozessierte Form stärker vertreten (Reichenbach *et al.* 2008). Ihre Expression unterliegt vermutlich der Kontrolle eines  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotors (Urban and Vogel 2008) und die Menge an GlmY in der Zelle ist direkt von der verfügbaren Menge an GlcN-6-P abhängig (Reichenbach *et al.* 2008). Obwohl GlmY eine hohe Homologie zu GlmZ aufweist, ist der für die Stabilisierung des *glmS*-Transkriptes verantwortliche Bereich in GlmY nicht konserviert, und GlmY allein ist nicht in der Lage, diese Stabilisierung zu vermitteln (Reichenbach *et al.* 2008; Urban und Vogel 2008). Über einen noch unbekanntem Mechanismus reguliert GlmY jedoch die Menge an unprozessierten GlmZ in der Zelle und somit die Stabilisierung des *glmS*-spezifischen Transkriptes. In Abwesenheit von *glmZ* kann GlmY keinen Einfluss auf die *glmS*-Expression nehmen, während die Wirkung von GlmZ unabhängig von GlmY ist (Reichenbach *et al.* 2008).



**Abb. 5.1.: Interaktion von GlmZ mit dem intergenischen Bereich zwischen *glmU* und *glmS***

In Abwesenheit von GlmZ bildet sich eine stabile Sekundärstruktur, die die Ribosomenbindestelle (SD) von *glmS* überdeckt und somit die Translation verhindert.

Die kleine RNA GlmZ interagiert mit der linken Hälfte dieser Sekundärstruktur, wodurch die Ribosomenbindestelle zugänglich wird.

Abbildung aus (Görke und Vogel 2008)

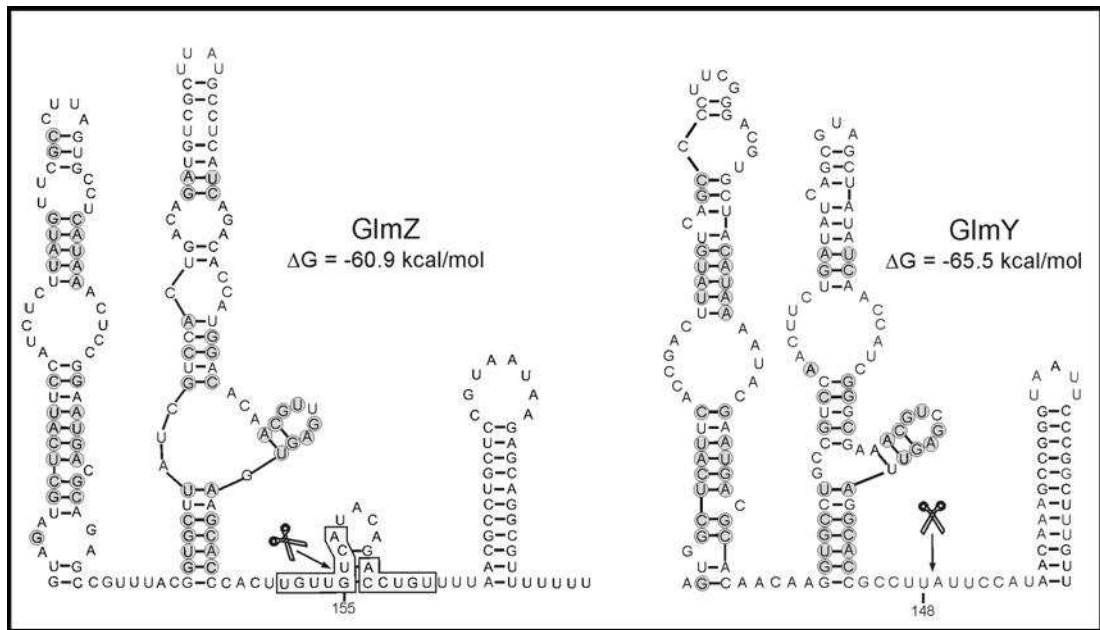
Neben der Deletion von *yhbJ* führt auch ein Defekt in der Poly-A-Polymerase I (PAP I), kodiert durch *pcnB*, zu einer Akkumulation von GlmS über den GlmZ-kontrollierten Mechanismus (Reichenbach *et al.* 2008). PAP I fügt Poly-(A)-Sequenzen an das 3'-Ende von mRNAs an, wodurch deren Degradation erleichtert wird (Hajnsdorf *et al.* 1995), besonders bei Transkripten, die aufgrund von Sekundärstrukturen keinen terminalen einzelsträngigen 3'-Bereich aufweisen (Khemici und Carpousis 2004). Es wird vermutet, dass Polyadenylierung die Transkripte für RNasen wie RNase II oder Polynukleotid-Phosphorylase zugänglich macht (Kushner 2007). Es wurde gezeigt, dass PAP I die kleine RNA GlmY polyadenyliert und so destabilisiert. Über die beschriebene Signaltransduktion von GlmY über GlmZ zur *glmS*-mRNA nimmt PAP I somit indirekten Einfluss auf die GlmS-Menge in der Zelle (Reichenbach *et al.* 2008; Urban und Vogel 2008).

Viele Details des Mechanismus der Feedback-Regulation der *glmS*-Expression sind weiterhin unklar. Es konnte bislang nicht festgestellt werden, welche Komponente initial die Verfügbarkeit von GlcN-6-P wahrnimmt und auf welcher Ebene diese Information an GlmY vermittelt wird. Eine weitere wichtige Frage ist, über welchen Mechanismus GlmY in der Lage ist, die Prozessierung von GlmZ zu kontrollieren. Da in einem *yhbJ*-Deletionsstamm die unprozessierte Form von GlmZ akkumuliert, ist eine Wirkung von GlmY stromaufwärts von oder in Kooperation mit YhbJ wahrscheinlich. Eine naheliegende Möglichkeit ist die Kontrolle der YhbJ-Menge in der Zelle durch GlmY. Obwohl weder eine plasmidische Überexpression des Gens noch eine Deletion einen Einfluß auf die Transkriptmenge von *yhbJ* hat (siehe 4.5.3.), kann nicht ausgeschlossen werden, dass GlmY über eine posttranskriptionelle Regulation Einfluß auf die YhbJ-Menge nimmt. Zudem konnte gezeigt werden, dass YhbJ *in vitro* mit

GlmY interagiert (siehe 4.6.2.). Es ist nicht auszuschließen, dass die Aktivität oder Spezifität von YhbJ durch GlmY gesteuert wird.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer kompetitiven Interaktion der kleinen RNAs mit YhbJ. Die Untersuchung der *in vitro*-Bindung von YhbJ an die unterschiedlichen Formen von GlmY und GlmZ zeigt eine Bevorzugung von GlmY gegenüber GlmZ und der prozessierten Form gegenüber einer Vollängen-Form. Interessanterweise ist die prozessierte Form von GlmY dominant in *E. coli*-Wildtyp-Zellen (Reichenbach *et al.* 2008). Somit wäre es möglich, dass YhbJ die Prozessierung von GlmZ durch physische Interaktion vermittelt, und dass eine höhere Affinität zu GlmY diese Vermittlung unterdrückt, wenn hohe Mengen dieser RNA vorhanden sind. Vorhersagen der Sekundärstrukturen von GlmZ und GlmY zeigen eine überraschend hohe Übereinstimmung: Beide sRNAs bilden potenziell eine spezifische mittlere Haarnadelstruktur, die sich durch einen konservierten, nicht-paarenden Bereich am Stamm der Haarnadel auszeichnen (Reichenbach *et al.* 2008; Urban und Vogel 2008) siehe Abb. 5.2.).

Eine Vorhersage der Sekundärstruktur der prozessierten Form von GlmY zeigt lediglich 4 bis 5 ungepaarte Nukleotide am 3'-Ende (Urban *et al.* 2007). Es wird angenommen, dass dies nicht ausreicht, um die RNA für degradierende Enzyme zugänglich zu machen. Die Polyadenylierung durch PAP I könnte demnach den Abbau der prozessierten sRNA vermitteln. Demnach könnte die Polyadenylierung von GlmY in Abhängigkeit der GlcN-6-P-Konzentration in der Zelle stattfinden. Dies wirft die Frage auf, ob eine weitere Komponente in die Kontrolle der *glmS*-Expression involviert, die ein entsprechendes Signal vermittelt. Ein derartiger Einfluss von PAP I auf die Aktivität einer regulatorischen RNA ist für RNA I beschrieben. Diese reprimiert die Replikation von ColEI-Plasmiden, und die aktive Form entsteht durch Prozessierung einer Vorläufer-RNA. Die prozessierte Form von RNA I ist instabil und wird durch die Polynukleotid-Phosphorylase abgebaut. In einem *pcnB*-Deletionsstamm ohne PAP I ist die Menge an aktiver RNA I etwa 10fach erhöht (Xu *et al.* 1993). Ebenso wird der Abbau der kleinen RNA SraL durch PAP I gesteuert (Viegas *et al.* 2007).



**Abb. 5.2.: Potenzielle Sekundärstrukturen von GlmZ und GlmY**

Die Sekundärstrukturen der beiden sRNAs wurden mittels mFold berechnet (siehe 2.8.). Konservierte Reste wurden durch Vergleich der Gensequenzen aus *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Citrobacter koseri*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Enterobacter sakazakii*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Photobacterium luminescens* subsp. *laumondii*, *Serratia marcescens* und *Yersinia pestis* mittels Vector NTI (siehe 2.8.) identifiziert und sind durch graue Kreise hervorgehoben. In GlmZ sind die Basen eingerahmt, die an der Interaktion mit dem *glmUS*-Transkript beteiligt sind. Die Scheren markieren die Prozessierungsstellen der sRNAs.

Die beiden sRNAs weisen eine ungewöhnliche Ausbuchtung in der rechten Hälfte der mittleren Haarnadelstruktur auf.

Abbildung aus (Reichenbach *et al.* 2008)

Viele Details dieses regulatorischen Ereignisses verbleiben unklar. Neben der elementaren Frage, warum so viele unterschiedlich Faktoren auf verschiedenen Ebenen wirken, um die Adaption der GlmS-Menge an den intrazellulären Spiegel von GlcN-6-P anzupassen, ist vor allem die Frage der Signalwahrnehmung essentiell für das weitere Verständnis dieser Regulation.

Die Komplexität des regulatorischen Ereignisses weist darauf hin, dass dieses nicht exklusiv die verstärkte Expression von *glmS* vermittelt, da dies über einen wesentlich einfacheren Mechanismus erreicht werden könnte. Die Involvierung multipler Protein- und sRNA-Faktoren in die Signalkaskade lässt vermuten, dass zusätzliche Determinanten gibt, die das Resultat der Regulation beeinflussen, wie beispielsweise die Verfügbarkeit weiterer Metabolite (die Edukte der von GlmS katalysierten Reaktion, Glutamat und Fruktose-6-Phosphat scheinen hier gute Kandidaten), oder dass die Komponenten der Signalkaskade zusätzliche, bislang nicht identifizierte regulatorische Aufgaben wahrnehmen, so dass die Kontrolle der *glmS*-Expression nur einen Aspekt eines regulatorischen Netzwerkes darstellt.

## 5.2. Die Funktion von YhbJ

YhbJ ist ein konserviertes Protein unbekannter Funktion, das eine P-Loop-ATPase-Domäne enthält. In *E. coli* ist es Teil des *rpoN*-Operons, und es ist in einer Vielzahl von Organismen in der Nähe von Homologen des PTS lokalisiert (Boël et al. 2003; Görke et al. 2005) (siehe auch 2.2.). YhbJ ist hochkonserviert in verschiedenen Prokaryoten, jedoch konnten keine Homologe in Eukaryoten identifiziert werden. Computergestützte Analysen identifizierten 23 Aminosäuren, die in allen 125 verwendeten Sequenzen von YhbJ-Homologen hinsichtlich Identität und Position perfekt konserviert sind, sowie 26 weitere Aminosäuren, die im Kontext von Größe und Ladung an ihren jeweiligen Positionen übereinstimmen. Diese Aminosäuren befinden sich zum Großteil innerhalb von drei konservierten Sequenzmotiven (siehe Abb. 4.17.).

Es ist bekannt, dass eine Deletion von *yhbJ* das regulatorische Ereignis zur spezifischen Expression des Gens der Glukosamin-6-Phosphat Synthase *GlmS* entkoppelt, was in einem starken Anstieg der intrazellulären Menge des Proteins resultiert. In diese Regulation sind auch zwei kleine, nicht-kodierende RNAs sowie die Poly(A)-Polymerase PAP I involviert, sie wird in 5.1. im Detail diskutiert.

YhbJ enthält ein konserviertes Walker A-Motiv, welches eine ATPase- oder GTPase-Aktivität impliziert, ein experimenteller Nachweis steht jedoch noch aus. Das Walker A-Motiv hat die Konsensus-Sequenz G-X<sub>4</sub>-G-(K/T) (Walker *et al.* 1982). Mutationen der beiden konservierten Glycin-Reste G8- und G13 weisen einen Einfluss auf die *glmS*-Expression auf, die mit dem von Wildtyp-YhbJ vergleichbar ist (vergleiche Abb. 4.22.). Des Weiteren kann in YhbJ-Homologen in Enterobakterien eine konservierte potenzielle RNA-Bindedomäne vorhergesagt werden (siehe Abb. 4.20). Es ist zu vermuten, dass diese für die gezeigte Bindung von YhbJ an verschiedene RNA-Spezies verantwortlich ist, zumal eine Deletion dieser Domäne die Kontrolle der *glmS*-Expression durch YhbJ aufhebt. In durchgeführten Analysen zeigt YhbJ eine Interaktion mit jeder der verwendeten RNAs, selbst mit einem RNA-Stück, das einem Teil der *lacZ*-mRNA entspricht. Obwohl diese Sequenz als „unspezifische“ RNA gewählt wurde, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch diese Sequenz Strukturen aufweist, die eine Bindung von YhbJ ermöglichen, beispielsweise eine Haarnadelstruktur oder ein bestimmtes Sequenzmotiv.

In dem Gram-positiven Bakterium *B. subtilis*, von dem bekannt ist, dass in ihm die Kontrolle der *glmS*-Expression durch ein *cis*-agierendes Ribozym gesteuert wird, ist diese RNA-Bindedomäne im YhbJ-Ortholog YvcJ nur schwach vorhersagbar, während

sie in Organismen wie *Vibrio cholerae* und *Staphylococcus aureus* völlig zu fehlen scheint.

YhbJ aus *E. coli* zeigt somit zwei Eigenschaften, die darauf hinweisen, dass die Kontrolle der *glmS*-Expression nicht die einzige Aufgabe dieses Proteins ist: Obwohl das Walker A-Motiv in allen 125 YhbJ-Homologen konserviert ist, haben Austausche der in diesem Motiv konservierten Glycin-Reste keinen Einfluss auf die Kontrolle der *glmS*-Expression. Umgekehrt hebt eine Deletion des potenziellen RNA-Bindemotivs am C-Terminus des Proteins den Einfluss von YhbJ auf die *glmS*-Expression auf, aber das Motiv ist nicht universell konserviert, sondern nur in einer Untergruppe der Sequenzen vertreten.

Anhand dieser Befunde kann spekuliert werden, dass YhbJ neben der Beeinflussung der GlmZ-Prozessierung noch weitere, bislang unbekannte Funktionen ausübt.

### **5.3. MicroArray Analysen eines $\Delta yhbJ$ -Stammes im Vergleich zum Wildtyp**

Um einen weiteren Einblick in die Funktion von YhbJ zu erlangen, sowie um mögliche weitere Ziele einer YhbJ-kontrollierten Regulation ähnlich der der *glmS*-Expression zu identifizieren, wurden MicroArray Analysen mit einem  $\Delta yhbJ$ -Stamm und dem korrespondierenden Wildtyp durchgeführt und die Expressionsniveaus in diesen Stämmen miteinander verglichen. Berücksichtigt man nur Gene, deren Expression mindestens um einen Faktor von 2,5 zwischen Wildtyp und *yhbJ*-Deletionsstamm verändert ist, so erhält man einen Satz von 93 Genen, die in einer *yhbJ*-Deletion stärker exprimiert werden, sowie 31 Gene, deren Expression signifikant herabgesetzt ist (siehe 4.6.)

Überraschenderweise konnte für 4 Gene (*ibpA*, *ibpB*, *pyrB* und *pyrI*) ein höherer Faktor der Aktivierung der Expression in Abwesenheit von YhbJ ermittelt werden als für *glmS*. Die in Abwesenheit von YhbJ verstärkt exprimierten Gene lassen sich in mehrere funktionell ähnliche Gruppen unterteilen:

1. Chaperone und Proteasen der Stressantwort (5.3.1.)
2. Enzyme der Pyrimidinsynthese (5.3.2.)
3. Komponenten von Transportkomplexen (5.3.3.)
4. Regulatorische Proteine (5.3.4.)

Ebenso können die Gene, deren Expression in einem *yhbJ*-Deletionsstamm herabgesetzt ist, in Gruppen zusammengefasst werden:



1. Das Kälteschockprotein *cspA* (5.3.5.)
2. Gene der Lipopolysaccharid-Kernsynthese (5.3.6.)
3. Regulatorische Proteine (5.3.7.)

Diese Gruppen werden nachfolgend im Detail diskutiert.

#### 5.3.1. Chaperone und Proteasen der Stressantwort

Die beiden Gene, deren Expression in Abwesenheit von YhbJ am stärksten erhöht ist, sind *ibpA* und *ibpB*, die zusammen ein bicistronisches Operon bilden. Ihre Expression untersteht der Kontrolle durch  $\sigma^{32}$ , einem alternativen Sigma-Faktor, der spezifisch für Gene der Hitzeschockantwort ist, jedoch wurde auch eine basale,  $\sigma^{32}$ -unabhängige Expression beobachtet (Laskowska *et al.* 1996b). Die korrespondierenden Genprodukte IbpA und IbpB werden auch als sHsp bezeichnet (*small heat shock proteins*, kleine Hitzeschockproteine). Sie sind universell konserviert und interagieren mit Aggregaten fehlgefalteter Proteine (Kuczynska-Wisnik *et al.* 2002). Ihre Überexpression vermittelt erhöhte Resistenz gegenüber Hitzeschock und oxidativen Stress (Kitagawa *et al.* 2000), führt aber gleichzeitig zu einer Retardierung des Abbaus aggregierter Proteine (Kedzierska *et al.* 1999). Deshalb ist die Expression dieser Gene unter normalen Wachstumsbedingungen strikt reprimiert (Mogk *et al.* 2003a).

Ebenfalls deutlich erhöht ist die Expression der Gene *mopA* und *mopB*, deren Produkte Untereinheiten des GroEL/GroES-Chaperon sind. Das Chaperon GroEL und seine regulatorische Untereinheit GroES sind essentiell für die korrekte Faltung von 85 cytosolischen Proteinen, von denen 13 essentiell sind. Die Faltung weiterer 165 Proteine ist zumindest teilweise von GroEL/GroES abhängig (Kerner 2005). Die Gene werden unter allen Wachstumsbedingungen exprimiert, jedoch verstärkt nach einem Hitzeschock (Fayet *et al.* 1989). Eine Überexpression von GroEL/GroES verhindert die Aggregation fehlgefalteter Proteine (Gragerov *et al.* 1992). Dabei agiert der Komplex vornehmlich in den späten Phasen der Proteinreifung (Gaitanaris *et al.* 1994).

Die Gene *hslU* und *hslV* kodieren für die Untereinheiten des prokaryotischen Homologs des Proteasoms in Eukaryoten. HslV ist eine Protease mit hoher Sequenzhomologie zu den sieben Untereinheiten des Proteasoms (Rohrwild *et al.* 1996), während HslU ein AAA-Protein (*ATPases associated with various cellular activities* / ATPasen verbunden mit unterschiedlichen zellulären Aktivitäten) der Clp/Hsp100-Familie ist (Rohrwild *et al.* 1996; Kwon *et al.* 2003). Das HslUV-System ist homolog zur ClpXP-Protease

(Gottesman *et al.* 1993). Es wird für das Wachstum bei hohen Temperaturen benötigt (Katayama *et al.* 1996) und wird ebenfalls verstärkt nach Hitzeschock exprimiert (Chuang *et al.* 1993).

Das DnaK/DnaJ/GrpE-System (KJE), kodiert durch die in einer *yhbJ*-Deletion ebenfalls verstärkt exprimierten Genen *dnaK*, *dnaJ* und *grpE*, ist homolog zum eukaryotischen Hsp70-Chaperonsystem. Es assistiert bei der korrekten Faltung neusynthetisierter Peptidketten, und nimmt eine Reihe weiterer Funktionen wahr, unter anderem im Abbau großer Proteinkomplexe (Bukau und Horwich 1998). DnaK stellt hierbei das eigentliche Chaperon dar, während DnaJ und GrpE sogenannte Ko-Chaperone sind. DnaJ stimuliert die ATPase-Aktivität von DnaK (Wall *et al.* 1994), während GrpE die Freisetzung von ADP + Pi reguliert (Liberek *et al.* 1991). Zusätzlich ist GrpE ein Thermosensor, der die Aktivität von DnaK bei hohen Temperaturen herabsetzt. Die Expression von *dnaK*, *dnaJ* und *grpE* ist ebenfalls  $\sigma^{32}$ -abhängig (Grimshaw *et al.* 2003). Im Gegensatz zu GroEL/GroES wirkt KJE in der frühen Phase der Proteinreifung (Gaitanaris *et al.* 1994).

Die Gene *yrfIH* kodieren für Hsp15 und Hsp33 (*Heat shock protein*, Hitzeschockprotein). Die Expression beider Gene wird durch Hitzeschock stark erhöht. Hsp33 wird durch oxidierende Bedingungen aktiviert: Es dimerisiert durch Ausbildung einer Disulfidbrücke, wodurch es Chaperon-Aktivität entwickelt (Vijayalakshmi *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu ist Hsp15 ein Protein, das unspezifisch Oligonukleotide bindet (Korber *et al.* 1999) und Ribosomen-Recycling durch Interaktion mit freien 50S-Untereinheiten propagiert (Korber *et al.* 2000).

Lon ist eine ATP-abhängige Protease und dient der Degradation fehlgefalteter Proteine sowie dem Abbau einer bestimmten Gruppe regulatorischer Proteine (Nishii *et al.* 2005). Es verhindert die Aggregation von Proteinen (Laskowska *et al.* 1996a) und in Abwesenheit von Lon ist diese stark erhöht (Rosen *et al.* 2002). Zumindest ein Teil der Lon-spezifischen Degradation missgefalteter Proteine ist abhängig von DnaK (Sherman und Goldberg 1992).

ClpB ist Teil der Clp/Hsp100-Familie, stellt innerhalb dieser jedoch einen Sonderfall dar, da es nicht mit einem proteolytischen Partner interagiert (Mogk *et al.* 2003b). ClpB kooperiert mit KJE in der Resolubilisierung aggregierter (Haslberger *et al.* 2007). Seine Expression ist ebenfalls  $\sigma^{32}$ -abhängig (Kitagawa *et al.* 1991).

Über *inaA* ist wenig bekannt. Seine Expression ist durch die Anwesenheit schwacher Säuren aktiviert (Slonczewski *et al.* 1987) und es ist vermutlich an der Vermittlung einer Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten beteiligt (White *et al.* 1992).

Die Protease Do wird durch das Gen *htrA* kodiert und stellt eine periplasmatische Serin-Protease dar, die für das Überleben der Zelle bei hohen Temperaturen notwendig ist (Seol *et al.* 1991). Sie degradiert abnormale periplasmatische Proteine, darunter auch aggregierte Proteinkomplexe (Strauch und Beckwith 1988). Do weist des Weiteren eine Chaperon-Aktivität auf, die unabhängig von der Protease-Aktivität ist. Die Protease-Aktivität ist strikt temperaturabhängig und ist bei niedrigen Temperaturen stark verringert (Spiess *et al.* 1999). Die Expression von *htrA* ist strikt  $\sigma^E$ -abhängig (Erickson und Gross 1989).

CpxP ist ein Regulator der Cpx-Antwort, die Resistenz gegenüber extracytoplasmatischen Stress vermittelt (Danese und Silhavy 1998). Es ist möglich, dass das Protein Chaperon-Aktivität besitzt (DiGiuseppe und Silhavy 2003).

HspQ stellt ein Hitzeschockprotein dar, das den Abbau fehlgefalteter Proteine vermittelt, jedoch selbst keine Protease-Aktivität aufweist. Seine Expression ist ebenfalls abhängig von  $\sigma^{32}$  (Shimuta *et al.* 2004).

Die sHsp IbpA und IbpB, das DnaK/DnaJ/GrpE-System und ClpB bilden eine proteolytische Triade zum Abbau von Protein-Aggregaten: Die sHsps interagieren mit aggregierenden Proteinen und halten diese in einer Form, in der sie zugänglich für eine Neufaltung durch DnaK sind. Während DnaK nur kleinere Proteinaggregate selbsttätig auflösen kann, ermöglicht die konzertierte Aktivität mit ClpB die effektive Auflösung großer Komplexe. In Abwesenheit von IbpAB oder ClpB ist ein Überleben der Zelle sowohl bei 37°C wie auch unter erhöhter Temperatur von 42°C nur bei artifiziell erhöhter Expression der Gene des KJE-Systems möglich (Mogk *et al.* 2003a).

Die erhöhte Expression von Chaperonen und Proteasen in einem  $\Delta yhbJ$ -Hintergrund lässt mehrere Erklärungen zu. Eine simple Variante ist, dass die massive Überexpression von *glmS* zu einer starken Bildung von Proteinaggregaten führt, die eine Stressantwort provozieren, die der auf einen Hitzeschock ähnelt. Allerdings zeigt ein  $\Delta yhbJ$ -Stamm keinerlei Wachstumsdefekt. Falls die Zelle durch die Entkopplung der *glmS*-Expression einem derartig starken Stress ausgesetzt wäre, sollte sich dies global auf die zellulären Prozesse auswirken und es wäre ein verlangsamtes Wachstum zu erwarten.

Eine Überexpression von *glmZ* führt zu einer erhöhten Aktivität einer *glmS-lacZ*-Reporterfusion (vergleiche Abb. 4.5). Sollte es sich bei den beobachteten Effekten auf die Expression von Genen, deren Produkte an der Hitzeschockantwort beteiligt sind, um

einen sekundären Effekt durch die erhöhte GlmS-Synthese handeln, so sollte eine Überexpression von *glmZ* vergleichbare Auswirkungen haben. Wie unter 4.4. diskutiert ist dies nicht der Fall. Vielmehr ist die Transkription von *ibpAB* unter diesen Bedingungen herabgesetzt, während die anderen Gene dieser Gruppe keine signifikante Veränderung ihrer Expression aufweisen.

Ein Großteil der hier genannten Gene steht unter Kontrolle von  $\sigma^{32}$ , welcher eine Antwort auf Hitzeschock vermittelt, und viele der Genprodukte sind notwendig für das Überleben der Zelle unter hohen Temperaturen. Die Expression von *rpoH* ist äußerst komplex reguliert und es sind 6 Promotoren beschrieben, von denen aus das Gen transkribiert werden kann. Darunter finden sich zwei konstitutive  $\sigma^{70}$ -abhängige Promotoren sowie ein  $\sigma^{24}$ -abhängiger und ein Hitzeschock-abhängiger Promotor (Erickson und Gross 1989; Wang und Kaguni 1989). Interessanterweise wurde der Promotor P6 vor *rpoH* als  $\sigma^{54}$ -abhängig beschrieben, jedoch ist das korrespondierende Aktivatorprotein unbekannt (Janaszak *et al.* 2007). Das Gen unterliegt einer posttranskriptionellen Kontrolle der Translation: Eine stabile Sekundärstruktur im 5'-Bereich des Transkriptes verhindert die Translation bei niedrigen Temperaturen und dient als Thermosensor (Morita *et al.* 1999).

Dies eröffnet die faszinierende Möglichkeit, dass YhbJ hier, parallel zu der Kontrolle der *glmS*-Expression, einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Stabilität der inhibitorischen Sekundärstruktur hat. Die Abwesenheit von YhbJ könnte eine Destabilisierung der Sekundärstruktur bewirken, die nachfolgend die Translation der *rpoH*-mRNA ermöglicht, wodurch die Expression der  $\sigma^{32}$ -abhängigen Gene initiiert werden kann.

Interessant in diesem Zusammenhang ist die Expression von *rpoH* in Abwesenheit hoher Temperaturen bei Induktion mit Ethanol und die nachfolgende Induktion von Genen der Hitzeschock-Antwort über einen unbekanntem Mechanismus (VanBogelen *et al.* 1987) und eine Expression der  $\sigma^{32}$ -abhängigen Gene bei Hemmung der DNA-Gyrase (Mizushima *et al.* 1996), die beide einen alternativen, Hitzeschock-unabhängigen Weg der *rpoH*-Expression implizieren.

### 5.3.2. Enzyme der Pyrimidinsynthese

Die Expression der Gene *pyrB* und *pyrI* ist in einem *yhbJ*-Deletionsstamm um einen Faktor von 25 (*pyrB*) beziehungsweise 20 (*pyrI*) erhöht. Das Gen *pyrB* kodiert für die katalytische Untereinheit der Aspartat-Transcarbamoylase (ATCase), das Gen *pyrI* für

die regulatorische Untereinheit (Neidhardt *et al.* 1996). Sie bilden ein gemeinsames Operon, das unter einer Attenuationskontrolle durch PyrL steht (Levin und Schachman 1985). Die Expression von *pyrL* ist in Abwesenheit von YhbJ ebenfalls um einen Faktor von 7,5 erhöht.

Die ATCase besteht aus je sechs katalytischen und regulatorischen Untereinheiten und katalysiert den initialen Schritt der *de novo*-Synthese von Pyrimidinen, die Kondensation von Carbamoyl-Phosphat und Aspartat zu Carbamoyl-L-Aspartat und Orthophosphat (Pardee und Yates 1956). Die Enzymaktivität wird durch CTP gehemmt (Gerhart und Pardee 1962) und durch ATP erhöht (Bethell *et al.* 1968). Beide Effektoren konkurrieren hierbei um dieselbe Bindestelle an der regulatorischen Untereinheit (Honzatko *et al.* 1979).

Die Expression von *pyrBI* erfolgt von zwei Promotoren stromaufwärts von *pyrB* und unterliegt einer UTP-abhängigen Attenuationskontrolle: Vor dem Start-Codon von *pyrB* befindet sich ein Bereich, der im Transkript zwei Haarnadelstrukturen ausbildet, welchen eine Sequenz multipler Uridine folgt. Falls ausreichende Mengen UTP in der Zelle zur Verfügung stehen, ist es wahrscheinlich, dass die RNA-Polymerase die Transkription nach der zweiten Haarnadelstruktur terminiert. Falls der intrazelluläre UTP-Spiegel gering ist, so pausiert die RNA-Polymerase an der ersten Sekundärstruktur und die beginnende Translation des PyrL-Peptides verhindert die Ausbildung der zweiten Haarnadelstruktur, so dass die Transkription fortgeführt werden kann (Christie *et al.* 1981). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass die RNA-Polymerase in Abhängigkeit von der UTP-Konzentration an der ersten Haarnadelstruktur verweilt (Turnbough *et al.* 1983) und ein Entfernen der Sekundärstrukturen erhöht die *pyrBI*-Expression signifikant (Levin und Schachman 1985).

Ein weiteres Gen, dessen Expression in einer *yhbJ*-Deletion erhöht ist, ist *carA*. Das korrespondierende Genprodukt, CarA, bildet zusammen mit CarB die Carbamoyl-Phosphat-Synthase, welche die Bildung von Carbamoyl-Phosphat katalysiert. Dies ist wie beschrieben eines der Substrate des PyrBI-Komplexes (Thoden *et al.* 1999).

GlmS katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Synthese von Peptidoglycan und Lipopolysacchariden über das zentrale Intermediat UDP-GlcNAc (Badet *et al.* 1987). Die erhöhte Expression der Gene für die Carbamoyl-Phosphat Synthase-Untereinheit CarA und der ATCase könnte bedeuten, dass eine Entkopplung der *glmS*-Expression in Abwesenheit von YhbJ zu einer Verarmung der Zelle an Pyrimidinen führt, da UTP von GlmU verbraucht wird, um UDP-GlcNAc zu synthetisieren (Mengin-Lecreulx und van Heijenoort 1994). Dies würde zu einem

erhöhten Bedarf an Pyrimidin-Vorläufern führen was eine verstärkte Expression der entsprechenden Enzyme nach sich ziehen würde.

### 5.3.3. Komponenten von Transportkomplexen

Die Expression der Gene *mglABC*, welche für Bestandteile eines Galaktose-Transporters kodieren, ist in einem  $\Delta yhbJ$ -Hintergrund um einen Faktor von 7 erhöht. Sie sind in einem gemeinsamen Operon lokalisiert (Harayama *et al.* 1983), welches einer komplexen Regulation unterliegt und dessen Expression durch  $\sigma^{38}$  (Notley-McRobb *et al.* 2002), die Regulatoren GalS und GalR (Geanacopoulos und Adhya 1997) und den Regulator FlhDC (Pruss *et al.* 2001) beeinflusst wird. Der MglABC-Transporter gehört zur ABC-Superfamilie (*ATP-binding cassette*, ATP-Bindekassette) (Wu und Mandrand-Berthelot 1995). MglA stellt die ATP-bindende Komponente dar, MglB ist ein periplasmatisches Galaktose-bindendes Protein und MglC ein integrales Membranprotein (GOA *et al.* 2001). Zusätzlich dient MglB als Chemorezeptor für Galaktose (Scholle *et al.* 1987).

YhdY ist Bestandteil des YhdWXYZ-ABC-Transporter. Diese Proteine sind allesamt nicht näher charakterisierte Mitglieder der ABC-Superfamilie, wobei YhdY eine membranständige Komponente darstellt. Aufgrund der Sequenz der Proteine wird angenommen, dass es sich um einen ATP-abhängigen Transporter für Aminosäuren handelt (Saurin *et al.* 1999). Die Expression des *yhdWXYZ*-Operons wird durch NtrC kontrolliert (Reitzer und Schneider 2001), dessen Gen *glnG* in Abwesenheit von YhbJ ebenfalls verstärkt exprimiert wird (siehe 4.3.4.).

Das Gen *tnaB* kodiert für einen von drei bekannten Transportern für Tryptophan in *E. coli* und bildet zusammen mit *tnaA* ein Operon (Deeley und Yanofsky 1981). Es ist zu beachten, dass auch die Expression von *tnaA*, welches für eine Tryptophanase kodiert, in einer *yhbJ*-Deletion deutlich erhöht ist. Die Transkription des *tnaAB*-Operons ist durch einen Tryptophan-abhängigen Antiterminationsmechanismus reguliert und unterliegt der Katabolitenrepression (Gollnick und Yanofsky 1990). TnaB ist ein Mitglied der ArAAP-Familie der Aminosäuretransporter und seine Rolle ist hauptsächlich die Aufnahme von Tryptophan für die katabole Nutzung (Yanofsky *et al.* 1991).

CycA ist ein weiterer Aminosäuretransporter, dessen Gen in einem *yhbJ*-Deletionsstamm verstärkt exprimiert wird. Es ist beteiligt an der Aufnahme von Glycin, Serin und Alanin (Robbins und Oxender 1973).

Das Gen *yjcG* kodiert für eine Acetat/Glykolat-Permease (Gimenez *et al.* 2003).

BglF ist ein Protein, das die EIIA-, EIIB- und EIIC-Domäne enthält und somit einen Teil des PTS darstellt. Das korrespondierende Operon wird in Wildtyp-Zellen von *E. coli* nicht exprimiert, kann jedoch durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden (Reynolds *et al.* 1986; Schnetz und Rak 1992; Kawula und Lelivelt 1994; Khan und Isaacson 1998). BglF ermöglicht die Aufnahme von  $\beta$ -Glukosiden in die Zelle (Postma *et al.* 1993) und übt neben dem Transport noch verschiedene regulatorische Funktionen aus (Amster-Choder 2005).

Ein weiterer Bestandteil eines Aminosäure- oder in diesem Fall Oligopeptid-Transporters, dessen Gen in Abwesenheit von YhbJ verstärkt exprimiert wird, ist OppA. Dieses Protein ist Teil des OppABCDF-Transportkomplexes, der ein Mitglied der ABC-Superfamilie ist (Pearce *et al.* 1992). Der Komplex importiert kurze Oligopeptide mit einer Länge von bis zu 5 Aminosäuren, jedoch keine freien Aminosäuren (Guyer *et al.* 1986)). OppA stellt hierbei die periplasmatische Bindekomponente dar, die eine hohe Affinität zu Oligopeptid-Substraten aufweist (Tame *et al.* 1994).

GlnH ist ein Teil des hochaffinen Glutamintransporters GlnHPQ, der ebenfalls ein Mitglied der Superfamilie der ABC-Transporter ist (Wu und Mandrand-Berthelot 1995). GlnH ist das periplasmatische Glutamin-bindende Protein des Systems (GOA *et al.* 2001) und untersteht der Kontrolle durch NtrC (Reitzer und Schneider 2001), dessen Gen *glnG* in Abwesenheit von YhbJ ebenfalls verstärkt exprimiert wird (siehe 4.3.4.).

Auch ArtP ist Teil eines ABC-Transportkomplexes, in diesem Fall des ArtPMQJI-Transporters für Arginin (Linton und Higgins 1998). ArtP ist die cytoplasmatische ATP-bindende Komponente des Komplexes (Wissenbach *et al.* 1995).

CorA ist Teil eines Transporters der MIT-Familie (*Metal ion transporter*, Transporter für Metall-Ionen), welcher aus den Proteinen CorABCD besteht und für die Aufnahme von Magnesium-Ionen verantwortlich ist. CorA alleine ermöglicht den Einstrom von Magnesium-Ionen, während für einen Export von  $Mg^{2+}$  neben CorA auch die anderen Komponenten des Systems notwendig sind (Smith *et al.* 1993). Neben Magnesium kann CorA auch Nickel- und Kobalt-Ionen transportieren (Hmiel *et al.* 1986).

Das Gen *putP* kodiert für einen Natrium/Prolin-Symporter (Reizer *et al.* 1994b), der auch am Transport von Propionat beteiligt ist (Reed *et al.* 2006).

NmpC schließlich stellt ein Mitglied der GBP-Familie (*General bacterial porins*, allgemeine bakterielle Porine) dar (Zhai und Saier 2002). Es handelt sich wahrscheinlich um ein Wasser-gefülltes Porin der äußeren Membran (Hindahl *et al.*

1984). Das Protein ist vermutlich mit Peptidoglykan assoziiert (Pugsley und Schnaitman 1978).

Die erhöhte Expression der Gene *yhdY* und *glnH* ist vermutlich bedingt durch die 6,5fach erhöhte Expression des Gens *glnG*, dessen Produkt einen Aktivator der  $\sigma^{54}$ -abhängigen Genexpression darstellt und dessen Kontrolle des *yhdWXYZ*- und *glnHFQ*-Operons beschrieben ist (Reitzer und Schneider 2001).

Sechs der hier genannten Gene kodieren für Bestandteile von Transportern für Aminosäuren oder Oligopeptide. Der Grund hierfür ist jedoch unklar. Zwar würde eine stark erhöhte Aktivität der Glukosamin-6-Phosphat-Synthase GlmS der Zelle Glutamin entziehen, da sie die Bildung von Glukosamin-6-Phosphat aus Fruktose-6-Phosphat und Glutamin katalysiert, jedoch entsteht in dieser Reaktion auch Glutamat, welches unter Aufwendung von ATP wieder zu Glutamin regeneriert werden kann. Eine derart starke Aktivität von GlmS würde der Zelle weiterhin große Mengen Fruktose-6-Phosphat entziehen. Dieses kann zwar ebenfalls regeneriert werden (durch den Abbau von GlcN-6-P über NagB), jedoch ist keine verstärkte Expression des *nag*-Operons zu beobachten und auch die Expression von Schlüsselenzymen des Energiestoffwechsels ist unverändert. Dies lässt es unwahrscheinlich erscheinen, dass die Aktivität von GlmS als sekundären Effekt die verstärkte Expression der Gene für Transportproteine verursacht. Die Expression der Gene *mglA* und *mglB* ist in Abwesenheit von YhbJ deutlich erhöht. Unter Überexpression von *glmZ* (*mglB*) beziehungsweise von *glmZ* oder *glmY* (*mglA*) ist ihre Expression jedoch reprimiert (siehe 4.4.). Dies lässt darauf schließen, dass der Effekt einer *yhbJ*-Deletion auf ihre Expression kein Sekundäreffekt der verstärkten *glmS*-Expression ist, sondern auf einem Mechanismus beruht, der diese Komponenten involviert.

#### 5.3.4. Gene regulatorischer Proteine mit erhöhter Expression im $\Delta yhbJ$ -Hintergrund

Das Gen *yhbJ* ist mit *rpoN* kolokalisiert, welches für den alternativen Sigma-Faktor 54 kodiert (siehe 1.2.). Die Expression  $\sigma^{54}$ -abhängiger Promotoren ist strikt durch die Aktivität eines Aktivatorproteins kontrolliert. NtrC ist ein derartiges Aktivatorprotein (Reitzer 2003) und die Expression des korrespondierenden Gens ist in Abwesenheit von YhbJ um den Faktor 6,5 erhöht. NtrC ist der *Response Regulator* des NtrBC-Zweikomponentensystems, welches auf eine Limitierung verwertbaren Stickstoffs oder Kohlenstoffs reagiert (Reitzer und Magasanik 1985). Es aktiviert die Expression



verschiedener Gene der Stickstoff-Assimilation, darunter auch *glnH* und *yhdY* sowie seine eigene Expression.

CaiF ist ein transkriptioneller Aktivator, der unter anaeroben Bedingungen und in Anwesenheit von Carnitin die Expression der Gene des Carnitin-Stoffwechsels aktiviert, namentlich das *caiTABCD*E- und das *fixABCX*-Operon (Eichler *et al.* 1996). Außer in den Promotorregionen dieser beiden Operons konnten durch Computeranalysen keine weiteren CaiF-Bindestellen identifiziert werden (Buchet *et al.* 1999).

Im Gegensatz zu CaiF ist FrvR ein negativer transkriptioneller Regulator, der exklusiv die Expression des eigenen *frv*-Operons inhibiert (Reizer *et al.* 1994a).

RhaS ist ein transkriptioneller Aktivator, der in Anwesenheit von L-Rhamnose die Expression des *rhaBAD*-Operons (Egan und Schleif 1993) und *rhaT*-Operons (Via *et al.* 1996) aktiviert, deren Genprodukte dem Transport und der Degradierung von Rhamnose dienen. Die Aktivierung der Expression erfolgt kooperativ mit CRP (*cAMP receptor protein*, Rezeptorprotein für zyklisches AMP) (Holcroft und Egan 2000). Zudem ist die RhaS-vermittelte Expression besonders hoch induziert, wenn der intrazelluläre Spiegel an zyklischen AMP hoch ist (Wickstrum *et al.* 2005).

Der negative Regulator IscR ist Teil einer interessanten Feedback-Regulation: Der aktive Regulator enthält einen  $[2\text{Fe-2S}]^+$ -Cluster und inhibiert die Expression des eigenen *iscRSUA*-Operons. Wenn die Synthese solcher Cluster durch äußere Einflüsse eingeschränkt ist, entsteht eine IscR-Form, der dieser Cluster fehlt. Dadurch verliert es seine inhibierende Wirkung und das Operon wird exprimiert (Schwartz *et al.* 2001).

Das Cpx-System in *E. coli* vermittelt Resistenz gegenüber extracytoplasmatischen Stress. Seine Expression unterliegt einer negativen Regulation durch CpxP (Danese und Silhavy 1998). Dies erfolgt durch eine Inhibition der Sensor-Kinase CpxA, welche über den *Response Regulator* CpxR die Cpx-Antwort vermittelt (DiGiuseppe und Silhavy 2003). Die Expression von *cpxP* selbst unterliegt der Kontrolle durch das CpxAR-Zweikomponentensystem, so dass es sich hier um eine Feedback-Inhibition handelt (Danese und Silhavy 1998). Eine *cpxP*-Mutante ist ferner nur eingeschränkt zur Bildung von Biofilmen fähig (Beloin *et al.* 2004).

Die erhöhte Expression von *glnG* spiegelt sich in der ebenfalls erhöhten Expression der Gene *yhdY* und *glnH* wieder, welche unter der Kontrolle des durch *glnG* kodierten Proteins NtrC stehen. Für die anderen Regulatoren, deren Genexpression in einem *yhbJ*-Deletionshintergrund erhöht ist, ist allerdings keine gleichzeitige Erhöhung der Zielgene

ersichtlich. Ein Grund hierfür könnte das Fehlen entsprechender externer Signale sein (beispielsweise ein hoher Spiegel zyklischen AMPs im Falle von RhaS). CpxP, IscR und FrvR wirken jedoch autoregulatorisch auf die eigene Expression, so dass eine erhöhte Expression dieser Gene höchst unerwartet ist. Der Mechanismus, der in Abwesenheit von YhbJ zu einer erhöhten Expression der korrespondierenden Gene führt, verbleibt kryptisch.

#### 5.3.5. Das Kälteschockprotein CspA

In Abwesenheit von YhbJ ist die Expression von *cspA* dramatisch herabgesetzt. Das korrespondierende Protein ist ein RNA-Chaperon, das die Bildung sekundärer RNA-Strukturen bei tiefen Temperaturen verhindert (Jiang *et al.* 1997). Das *cspA*-Transkript ist sehr instabil bei 37°C und wird durch eine RNase E-abhängige Prozessierung am 3'-Ende destabilisiert (Hankins *et al.* 2007).

CspA aktiviert die Expression von *gyrA* (Brandi *et al.* 1994) und dient nach einem Kälteschock als transkriptioneller Aktivator von *hns* (La Teana *et al.* 1991). Es ist ein negativer Regulator seiner eigenen Expression.

Obwohl der Zusammenhang zwischen YhbJ und CspA unklar ist, so ist es doch eine interessante Beobachtung, dass in Abwesenheit von YhbJ Gene der Hitzeschock-Antwort aktiviert (siehe 4.3.1.) und mit *cspA* und *yihK* (siehe 4.3.6) Gene der Kälteschock-Antwort reprimiert werden. Ein weiterer beachtenswerter Aspekt ist die Destabilisierung des *cspA*-Transkriptes durch RNase E. Eine Möglichkeit, dass die Kontrolle *cspA*-Expression einem Mechanismus unterliegt, der von ähnlichen Faktoren kontrolliert wird wie die *glmS*-spezifische Expression.

#### 5.3.6. Gene der Lipopolysaccharid-Kernsynthese

Neben Peptidoglykan sind Lipopolysaccharide das zweite Endprodukt des Syntheseweges, dessen initiale Reaktion die Herstellung von Glukosamin-6-Phosphat ist (vergleiche 1.3.). Der letzte gemeinsame Vorläufer ist UDP-GlcNAc.

In einem *yhbJ*-Deletionshintergrund ist die Expression einiger Gene, die für Proteine der Lipopolysaccharid-Kernsynthese kodieren, erniedrigt. Den höchsten Effekt hat die Abwesenheit von YhbJ auf die Expression von *rfaK*. Dieses Gen kodiert für die Heptosyl-Transferase IV. RfaK ist verantwortlich für das Anfügen von Heptose IV an den Glc III-Rest des äußeren Kerns (Heinrichs *et al.* 1998) und möglicherweise auch für

das Anfügen von GlcNAc an eine Heptose des inneren Kerns (Klena *et al.* 1992). Ebenfalls in Abwesenheit von YhbJ ist die Expression von *rfaY* und *rfaZ* erniedrigt, die Bestandteil desselben Operons wie *rfaK* sind und ebenfalls an der Synthese des Lipopolysaccharid-Kerns beteiligt sind.

Die Phosphorylierung von Heptose II des inneren Kerns wird durch die Kinase RfaY durchgeführt, während RfaZ am Hinzufügen der KDO III –Einheit an den KDO II-Rest des inneren Kerns beteiligt ist. Eine Überproduktion von RfaZ führt zu Fehlern in der Lipopolysaccharid-Biosynthese, beispielsweise verringerte Mengen O-Antigens oder unvollständige Strukturen des äußeren Kerns (Frirdich *et al.* 2003), während eine Deletion zu einem Defekt in der Synthese der Lipooligosaccharide der Zellhülle führt (Klena *et al.* 1992).

Das Gen *wbbK* kodiert für ein Protein, von dem ebenfalls angenommen wird, dass es an der Synthese der Lipopolysaccharide beteiligt ist (GOA *et al.* 2001) und seine Expression ist ebenfalls in Abwesenheit von YhbJ erniedrigt.

YihK ist ein Protein, für das ebenfalls eine Rolle in der Biosynthese von Lipopolysacchariden vorhergesagt wurde, da eine Mutation des korrespondierenden Gens den Defekt einer *rfaQ*-Mutante unterdrücken kann (Moller *et al.* 2003). Zudem ist das Protein für das Überleben bei niedrigen Temperaturen notwendig (Pfennig und Flower 2001). In enteropathogenen *E. coli*-Stämmen ist YihK in die Pathogenese involviert (Grant *et al.* 2003).

Die verringerte Expression von Genen, deren korrespondierende Proteine eine wichtige Rolle in der Synthese von Lipopolysacchariden spielen, erscheint zunächst kontraintuitiv. In Abwesenheit von YhbJ ist die Expression von *glmS* stark erhöht, so dass in der Zelle eine große Menge UDP-GlcNAc für die Synthese von Lipopolysacchariden zur Verfügung stehen sollte. Dies ist allerdings nur eine von vielen Komponenten, die zum Aufbau funktioneller Lipopolysaccharide benötigt werden. Ein Überschuss an UDP-GlcNAc kann sogar einen Mangel an anderen Vorläufern induzieren, indem die kontinuierliche Verfügbarkeit zu einer starken Synthese von Lipopolysacchariden führt, wodurch andere Komponenten schneller verbraucht würden, als sie nachproduziert werden können. Dies könnte zu einer verringerten Expression der Gene führen, die die Enzyme des Lipopolysaccharid-Aufbaus kodieren. Beispielsweise könnte eine Induktion der Genexpression durch ein anderes Substrat als UDP-GlcNAc wegfallen oder die Expression dieser Gene unterliegt einer Feedback-Inhibition durch das

Endprodukt des Syntheseweges, und eine erhöhte Verfügbarkeit von UDP-GlcNAc führt zu einer Akkumulation dieser Endprodukte.

### 5.3.7. Gene regulatorischer Proteine mit erniedrigter Expression im $\Delta yhbJ$ -Hintergrund

Neben den unter 4.3.4. diskutierten Genen regulatorischer Proteine, deren Expression in Abwesenheit von YhbJ erhöht ist, gibt es auch ein Set an Genen regulatorischer Proteine, die unter diesen Bedingungen schwächer exprimiert werden:

TdcA ist ein transkriptioneller Aktivator, der Gene kontrolliert, deren Produkte im Abbau von Aminosäuren involviert sind. Er kontrolliert vor allem die Expression des *tdcABCDEFGG*-Operons (Hagewood *et al.* 1994). Widersprüchlicherweise ist das durch TdcA kontrollierte Gen *tdcD* in Abwesenheit von YhbJ um einen Faktor von 2,5 stärker exprimiert.

Das Protein HepA ist eine ATPase, die mit der RNA-Polymerase interagieren kann und einen generellen Aktivator der Transkription an eng spiralisierten DNA-Abschnitten darstellt (Sukhodolets *et al.* 2001).

Das Gen *ydaR* kodiert für einen nicht näher charakterisierten potenziellen transkriptionellen Regulator (Perez-Rueda *et al.* 2004).

MelR ist der transkriptionelle Aktivator der Expression des *melAB*-Operons, dessen Genprodukte am Abbau von Melibiose, einem Disaccharid, beteiligt sind. Die Regulation erfolgt in Kooperation mit CRP (*cAMP receptor protein*, Rezeptorprotein für zyklisches AMP) (Belyaeva *et al.* 2000). MelR reprimiert in Abwesenheit von Melibiose seine eigene Expression (Tamai *et al.* 2000).

Auch hier, wie schon im Fall der Gene regulatorischer Proteine mit erhöhter Expression in Abwesenheit von YhbJ, können die beobachteten Veränderungen in der Expression der Regulatoren nicht mit korrelierenden Effekten auf die von ihnen kontrollierten Gene verknüpft werden. Im Falle von TdcA widersprechen die Ergebnisse der MicroArray Analyse sogar den beschriebenen Verhalten der Expression: TdcA ist ein transkriptioneller Aktivator des *tdcABCDEFGG*-Operons und seine Expression ist in Abwesenheit von YhbJ um einen Faktor von 4 erniedrigt. Trotz der anzunehmenden Reduktion der Aktivierung des *tdcABCDEFGG*-Operons aufgrund der verringerten TdcA-Menge ist die Expression von *tdcD* um einen Faktor von 2,5 erhöht. Es ist nicht auszuschließen, dass die Unterschiede durch Effekte stromabwärts des Promotors ausgelöst werden. Beispielsweise könnte TdcA ein sehr stabiles Protein sein, so dass

trotz der verringerten Expression noch immer signifikante Mengen des Regulators in der Zelle vorhanden sind, und diese die Expression des von ihnen kontrollierten Operons noch immer aktivieren können. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass von sieben kotranskribierten Genen des Operons nur für *tdcD* eine signifikant erhöhte Expression nachweisbar ist.

Eine weitere Möglichkeit ist eine alternative Transkription des Gens, die bislang unbekannt ist und die unabhängig von TdcA stattfindet. Um die genaue Ursache des beobachteten widersprüchlichen Effekts aufzuklären sind jedoch weitergehende Analysen notwendig.

#### **5.4. Vergleich der Auswirkungen einer *yhbJ*-Deletion mit der Überexpression von GlmY und GlmZ in MicroArray Analysen**

In der AG RNA-Biologie des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie wurden MicroArray Analysen mit plasmidischer Überexpression der kleinen RNAs GlmY und GlmZ durchgeführt (K. Papenfort und J. Vogel, persönliche Kommunikation). Vergleicht man die Ergebnisse dieser Analysen mit denen der in dieser Arbeit durchgeführten MicroArrays mit einem *yhbJ*-Deletionsstamm, so zeigt sich zunächst nur eine geringe Überlappung der beeinflussten Gene. Lediglich 25 Gene zeigen sowohl in einer *yhbJ*-Deletion als auch unter Überexpression von *glmZ* oder *glmY* ein verändertes Transkriptionsprofil. Noch bemerkenswerter ist jedoch, dass lediglich vier dieser Gene ein mit dem hier vorgestellten Regulationsmechanismus konsistentes Verhalten aufweisen: Die Gene *glmS*, *rhaS*, *thiG* und *yhdY* werden sowohl in Abwesenheit von YhbJ als auch bei Überexpression einer der kleinen sRNAs. Dies impliziert, dass die Expression dieser Gene einer ähnlichen, wenn nicht übereinstimmenden, Regulation durch YhbJ und GlmY/GlmZ unterliegen.

Die restlichen 21 Gene, deren Expression sowohl in Abwesenheit von YhbJ als auch bei Überexpression von GlmY oder GlmZ verändert ist, zeigen ein gegensätzliches Verhalten: Alle von ihnen werden im *yhbJ*-Deletionsstamm verstärkt und bei Überexpression einer der kleinen RNAs verringert exprimiert.

Ein antagonistisches Verhalten von einer *yhbJ*-Deletion im Vergleich zur Überexpression ist unerwartet, wenn man die Ergebnisse der Untersuchung der *glmS*-spezifischen Expression berücksichtigt: In Abwesenheit von *yhbJ* akkumulieren die aktiven Formen der sRNAs, prozessiertes GlmY und unprozessiertes GlmZ. Ebenso konnte gezoegt werden, dass im Falle der Überexpression von *glmZ* oder *glmY*

ebenfalls die aktiven Formen akkumulieren (Reichenbach *et al.* 2008; Urban und Vogel 2008).

Unter diesem Gesichtspunkt zeigt sich, dass sowohl YhbJ wie auch GlmY und GlmZ spezifische Regulons haben. Weiterhin wurden in den MicroArray Analyse unter Überexpression von GlmY 109 Gene mit veränderter Expression identifiziert, unter Überexpression von GlmZ 60 Gene. Die Überlappung beträgt hier jedoch nur 3 Gene. Unter der Voraussetzung, dass eine Überexpression von GlmY die Prozessierung von GlmZ verhindert, kann spekuliert werden, dass die Expression dieser Gene indirekt von GlmY über diesen Effekt gesteuert wird. Andererseits lassen diese Ergebnisse die Vermutung zu, dass GlmY unabhängig von GlmZ agieren kann, beispielsweise durch direkte Interaktion mit Ziel-mRNAs oder durch die Beeinflussung der Stabilität anderer kleiner RNAs.

Im Falle von GlmZ kann spekuliert werden, ob die prozessierte Form der sRNA ebenfalls eine regulatorische Funktion hat. Diese würde dann die Expression der Gene erklären, die nicht mit dem GlmY-Regulon überlappen.

Aus dem Vergleich der MicroArray Analysen lassen sich somit drei Schlüsse ziehen:

1. Die Gene *glmS*, *thiG*, *rhaS* und *yhdY* folgen in ihrer YhbJ/GlmY/GlmZ-abhängigen Expression einem gemeinsamen Muster, das einen ähnlichen oder gleichen Mechanismus der Regulation wahrscheinlich macht.
2. Die geringe Überlappung der durch GlmY/GlmZ und YhbJ in ihrer Expression beeinflussten Gene lässt darauf schließen, dass diese unterschiedliche, spezifische Regulons besitzen und die in Abwesenheit von YhbJ beobachteten Effekte zu einem großen Teil nicht auf einem Mechanismus beruhen, an dem GlmY oder GlmZ beteiligt sind.
3. Da eine die plasmidische Überexpression von *glmY* und *glmZ* zu einer Aktivierung der spezifischen *glmS*-Expression führt (Kalamorz *et al.* 2007; Urban *et al.* 2007; Reichenbach *et al.* 2008; Urban und Vogel 2008), sollten unter diesen Bedingungen ähnliche Sekundäreffekte wie in Abwesenheit von YhbJ auftreten, wenn auch schwächer. Jedoch ist keine der unter 5.3. diskutierten Gruppen der durch YhbJ beeinflussten Gene durch Überexpression der kleinen RNAs signifikant beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass die beobachteten Effekte direkt auf die Abwesenheit von YhbJ zurückzuführen sind und keine sekundären Auswirkungen der Überexpression von *glmS* darstellen.

## 5.5. Expression des *rpoN*-Operons

Die Analyse der Expression des *rpoN*-Operons und somit von *yhbJ* (siehe 3.5.) ergab, dass die Expression zu 80% vom *rpoN*-Promotor ausgeht, während eine unvollständige Termination der Expression vom stromaufwärts gelegenen *lptB*-Promotor aus etwa 20% zu der Expression des *rpoN*-Operons beiträgt (vergleiche Abb. 4.23.).

Auffällig ist der Abfall der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität in der [*lptB-yhbJ*]-*lacZ*-Reporterfusion, welche neben dem *rpoN*-Promotor auch die stromabwärts gelegenen Gene *rpoN*, *hpf*, *ptsN* sowie ein 5'-Fragment des Gens *yhbJ* umfasst. Dies stimmt mit vorangegangenen Analysen der *rpoN*-Expression überein, in der eine ähnliche transkriptionelle Fusion (*lptB*(-177) bis *yhbJ*(+573)) ebenfalls eine deutlich verringerte Aktivität aufweist (Powell *et al.* 1995).

Dieser Effekt kann unterschiedliche Gründe haben. Da es sich um translationale Fusionen handelt, unterliegt die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität der Reporterfusionen direkt der Translationsstärke des Genes, an das *lacZ* fusioniert wurde. Demnach könnte der Abfall der Aktivität durch eine geringere Translationsrate von *yhbJ* gegenüber *rpoN* bedingt sein. Eine weitere Erklärung könnte die Anwesenheit einer schwachen Sekundärstruktur stromabwärts von *rpoN* sein, die eine Termination der Translation oder auch Transkription propagiert. Eine zusätzliche Promotoraktivität innerhalb des *rpoN*-Operons wurde postuliert (Powell *et al.* 1995), jedoch zeigen Analysen verkürzter interner Fragmente des Operons keine transkriptionelle Aktivität und eine Sequenzanalyse konnte keine potenziellen Promotoren identifizieren (B. Görke, persönliche Kommunikation).

Allerdings kann ein Einfluss der sRNAs GlmY und GlmZ nicht völlig ausgeschlossen werden. Die in 4.5.3. präsentierten Ergebnisse zeigen lediglich, dass sich diese beiden kleinen RNAs nicht auf die Transkription von *yhbJ* auswirken, sie lassen jedoch keinen Schluss auf einen eventuellen Einfluss von GlmY und GlmZ auf die Translationseffizienz zu. Es wäre möglich, dass die Ribosomenbindestelle von *yhbJ* in der mRNA aufgrund von Sekundärstrukturen nicht zugänglich ist, und die Bindung der mRNA mit einer der kleinen RNAs nötig ist, um die Expression des Gens zu ermöglichen. Umgekehrt könnte die Translation auch durch Interaktion mit einer sRNA stimuliert werden (Gottesman 2002).

## 5.6. Ausblick

Obwohl der Start- und Ausgangspunkt der spezifischen *glmS*-Expression aufgeklärt werden konnten (ein Mangel an GlcN-6-Phosphat führt zur Stabilisierung einer *glmS*-spezifischen mRNA), ist der genaue Ablauf der Regulation weiterhin unklar.

Besonders wichtig für ein weitergehendes Verständnis der Abläufe ist die Frage, wie das Signal in die regulatorische Kaskade eingespeist wird. Die Expression von *glmY* ist von  $\sigma^{54}$  abhängig, dessen Aktivität nur durch ein zusätzliches Aktivatorprotein vermittelt werden kann. Dieses potenzielle Aktivatorprotein ist ein wahrscheinlicher Kandidat für den Sensor des GlcN-6-P-Spiegels. Das Gen *glmY* ist in direkter Nachbarschaft der Gene des YfhAK-Zweikomponentensystems kodiert. Der *Response Regulator* YfhA ist ein potenzieller Aktivator für  $\sigma^{54}$ -abhängige Promotoren. Untersuchungen der *glmY*-Expression und einer möglichen Verknüpfung mit YfhAK werden momentan in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Um einen weiteren Einblick in die Funktion von YhbJ zu erhalten, sind verschiedene Richtungen möglich: Durch Überexpression und Aufreinigung von YhbJ-Derivaten mit Mutationen in der potenziellen RNA-Bindedomäne und in den anderen konservierten Motiven kann die Funktion dieser Domänen weiter charakterisiert werden, besonders hinsichtlich der Bindung von RNA, der vorhergesagten Fähigkeit zur ATP/GTP-Hydrolyse sowie einer möglichen Dimerisierung. Eine Aufklärung der Kristallstruktur von Protein:RNA-Komplexen kann weiteren Einblick in den Vorgang der RNA-Bindung geben. Zudem könnten mutierte Formen von GlmY und GlmZ in EMSAs mit YhbJ verwendet werden, um die RNA-Bindung des Proteins mit der Anwesenheit bestimmter Merkmale in der RNA zu verknüpfen (beispielsweise mit den Ausbuchtungen an den mittleren Haarnadelstrukturen der beiden sRNAs, siehe Abb.4.2.). Mittels SPINE (Herzberg *et al.* 2007) wäre es zudem möglich, Proteine zu identifizieren, die mit YhbJ interagieren.

Die Auswertung der MicroArray Analysen mit einem  $\Delta yhbJ$ -Stamm wird durch die parallele Wirkung zweier artifizieller Bedingungen erschwert: Die Auswirkungen der Abwesenheit von YhbJ sind hier kombiniert mit den Auswirkungen der Überexpression von *glmS*. Zwar können durch eine Abgleich der MicroArray Analysen unter Überexpression von *glmZ* und in Abwesenheit von YhbJ, wie unter 5.4. diskutiert, die Sekundäreffekte der verstärkten *glmS*-Expression subtrahiert werden, jedoch kommen hier wiederum zusätzliche Effekte und Sekundäreffekte durch die Wirkung der kleinen



RNA hinzu. Um die potenziellen Einflüsse der Abwesenheit von YhbJ von denen einer stark erhöhten *glmS*-Expression auf die Genexpression zu separieren, können MicroArray-Analysen mit Wildtyp-Kulturen durchgeführt werden, in denen durch Zugabe von Nva-FMDP die Produktion von GlmS in Anwesenheit physiologischer Mengen von YhbJ erhöht ist. Umgekehrt könnte durch die Mutation der für die Stabilisierung der *glmS*-spezifischen mRNA durch GlmZ verantwortlichen Nukleotide eine Überexpression von *glmS* in Abwesenheit von YhbJ verhindert werden, ohne eventuelle weitere Ziele von GlmZ zu beeinflussen.

Ein weiterer wichtiger Schritt in Zusammenhang mit der MicroArray Analyse der Auswirkungen der Deletion von *yhbJ* ist eine Verifizierung der Ergebnisse durch alternative Methoden. Beispielsweise könnte die Expression ausgewählter durch die Deletion in ihrer Expression beeinflusster Gene mittels Northern Blot Analyse oder durch Untersuchungen mit entsprechenden *lacZ*-Fusionen untersucht werden. Solche Analysen könnten zusätzlich auch bei gleichzeitiger Überexpression von plasmidständigen *yhbJ* durchgeführt werden. Falls in diesen Untersuchungen ein reproduzierbarer Effekt von YhbJ auf die Genexpression auftritt, könnte nachfolgend der Einfluß der in dieser Arbeit beschriebenen mutierten Formen von YhbJ untersucht werden. Dadurch könnten unter Umständen bestimmte konservierte Motive innerhalb von YhbJ mit einer Funktion verknüpft werden.

Daten aus der MicroArray Analyse des *yhbJ*-Deletionsstammes eröffnen des Weiteren die Möglichkeit, dass die Abwesenheit von YhbJ eine Translation der *rpoH*-mRNA, welche für den Sigma-Faktor der Hitzeschockantwort ( $\sigma^{32}$ ) kodiert, bei niedrigen Temperaturen ermöglicht. Dies ließe sich schnell und einfach überprüfen, indem die Expression einer translationalen *rpoH-lacZ*-Fusion im Wildtyp und in einem *yhbJ*-Deletionsstamm bei 37°C und 42°C verglichen wird.

Auch hier würden die zuvor vorgeschlagenen zusätzlichen MicroArray-Analysen hilfreich sein: Falls die Induktion der Hitzeschockantwort auf der Aggregation von GlmS durch Entkopplung der Gen-Expression in Abwesenheit von YhbJ beruht, so sollte dieser Effekt bei Nva-FMDP-induzierter Überexpression auch in Anwesenheit von YhbJ eintreten. Im umgekehrten Fall, wenn die Abwesenheit von YhbJ für den Effekt verantwortlich ist, sollte dieser auch in einer Mutante eintreten, in der die Entkopplung der *glmS*-Expression nicht mehr möglich ist.

In Verbindung mit der vorgeschlagenen *rpoH-lacZ*-Reporterfusion könnte auch der Effekt einer artifiziellen, plasmidgestützten Überexpression von *glmS* auf die Translationseffizienz von *rpoH* geprüft werden.

YhbJ weist Eigenschaften auf, die eine weitergehende Funktion als die Kontrolle der *glmS*-Expression implizieren: Das hierfür notwendige potenzielle RNA-Bindemotiv ist innerhalb der Proteinfamilie nicht konserviert, während Mutationen des hochkonservierten Walker A-Motiv der P-Loop-ATPase-Domäne keine Auswirkung auf die Fähigkeit von YhbJ zur Expressionskontrolle von *glmS* hat. Dies sind starke Hinweise auf eine zusätzliche Funktion von YhbJ. Um diese Hypothese weiter zu verfolgen könnten globale Analysen der Transkription und Translation in Stämmen durchgeführt werden, die Mutationen in den konservierten Motiven von YhbJ tragen, besonders mit Mutationen des Walker A-Motivs oder der potenziellen RNA-Bindedomäne.

Schließlich bleibt das Rätsel der unterschiedlichen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität der Reporterfusionen zur Untersuchung der Expression des *rpoN*-Operons. Um hier weitere Einblicke zu erlangen, sollte zunächst der Effekt einer Deletion und plasmidischer Überexpression der kleinen RNAs GlmY und GlmZ auf das Verhalten der Reporterfusionen untersucht werden. Zudem könnte eine Fusion der intergenischen Region zwischen *hpf* und *ptsN* an *lacZ* unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors genutzt werden, um mögliche posttranskriptionelle Regulationen zu detektieren.

## **6. Literaturverzeichnis**

**Aiba, H.** (2007). "Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs." Curr. Opin. Microbiol. **10**(2): 134-139.

**Aiba, H., S. Matsuyama, T. Mizuno und S. Mizushima** (1987). "Function of *micF* as an antisense RNA in osmoregulatory expression of the *ompF* gene in *Escherichia coli*." J Bacteriol **169**(7): 3007-3012.

**Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman** (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-410.

**Alvarez-Anorve, L. I., M. L. Calcagno und J. Plumbridge** (2005). "Why does *Escherichia coli* grow more slowly on glucosamine than on N-acetylglucosamine? Effects of enzyme levels and allosteric activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates." J Bacteriol **187**(9): 2974-2982.

**Amster-Choder, O.** (2005). "The *bgl* sensory system: a transmembrane signaling pathway controlling transcriptional antitermination." Curr Opin Microbiol **8**(2): 127-134.

**Andersen, J., N. Delihias, K. Ikenaka, P. J. Green, O. Pines, O. Ilercil und M. Inouye** (1987). "The isolation and characterization of RNA coded by the *micF* gene in *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res **15**(5): 2089-2101.

**Argaman, L., R. Hershberg, J. Vogel, G. Bejerano, E. G. Wagner, H. Margalit und S. Altuvia** (2001). "Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*." Curr. Biol. **11**(12): 941-950.

**Arluison, V., S. Hohng, R. Roy, O. Pellegrini, P. Regnier und T. Ha** (2007). "Spectroscopic observation of RNA chaperone activities of Hfq in post-transcriptional regulation by a small non-coding RNA." Nucleic Acids Res **35**(3): 999-1006.

**Bachmann, B. J.** (1972). "Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12." Bacteriol Rev **36**(4): 525-557.

**Badet, B., P. Vermoote, P. Y. Haumont, F. Lederer und F. LeGoffic** (1987). "Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location." Biochemistry **26**(7): 1940-1948.

**Bailey, T. L., N. Williams, C. Misleh und W. W. Li** (2006). "MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W369-373.

**Bartel, D. P.** (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.

**Bearne, S. L. und C. Blouin** (2000). "Inhibition of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase by reactive intermediate analogues. The role of the 2-amino function in catalysis." J Biol Chem **275**(1): 135-140.

- Belitsky, B. R. und A. L. Sonenshein** (1999). "An enhancer element located downstream of the major glutamate dehydrogenase gene of *Bacillus subtilis*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10290-10295.
- Beloin, C., J. Valle, P. Latour-Lambert, P. Faure, M. Kzreminski, D. Balestrino, J. A. Haagenen, S. Molin, G. Prensier, B. Arbeille und J. M. Ghigo** (2004). "Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression." Mol Microbiol **51**(3): 659-674.
- Belyaeva, T. A., J. T. Wade, C. L. Webster, V. J. Howard, M. S. Thomas, E. I. Hyde und S. J. Busby** (2000). "Transcription activation at the *Escherichia coli* melAB promoter: the role of MelR and the cyclic AMP receptor protein." Mol Microbiol **36**(1): 211-222.
- Bentley, R. und R. Meganathan** (1982). "Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria." Microbiol Rev **46**(3): 241-280.
- Bessman, M. J., J. D. Walsh, C. A. Dunn, J. Swaminathan, J. E. Weldon und J. Shen** (2001). "The gene *ygdP*, associated with the invasiveness of *Escherichia coli* K1, designates a Nudix hydrolase, Orf176, active on adenosine (5')-pentaphospho-(5')-adenosine (Ap5A)." J Biol Chem **276**(41): 37834-37838.
- Bethell, M. R., K. E. Smith, J. S. White und M. E. Jones** (1968). "Carbamyl phosphate: an allosteric substrate for aspartate transcarbamylase of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **60**(4): 1442-1449.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau und Y. Shao** (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**(5331): 1453-1474.
- Boël, G., I. Mijakovic, A. Maze, S. Poncet, M. K. Taha, M. Larribe, E. Darbon, A. Khemiri, A. Galinier und J. Deutscher** (2003). "Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in Gram-negative bacteria." J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **5**(4): 206-215.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- Brandi, A., C. L. Pon und C. O. Gualerzi** (1994). "Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (CspA) of *Escherichia coli* with the promoter region of *hns*." Biochimie **76**(10-11): 1090-1098.
- Brennan, R. G. und T. M. Link** (2007). "Hfq structure, function and ligand binding." Curr. Opin. Microbiol. **10**(2): 125-133.
- Broschat, K. O., C. Gorka, J. D. Page, C. L. Martin-Berger, M. S. Davies, H. C. Huang Hc, E. A. Gulve, W. J. Salsgiver und T. P. Kasten** (2002). "Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate." J Biol Chem **277**(17): 14764-14770.

- Buchet, A., W. Nasser, K. Eichler und M. A. Mandrand-Berthelot** (1999). "Positive co-regulation of the *Escherichia coli* carnitine pathway *cai* and *fix* operons by CRP and the CaiF activator." Mol Microbiol **34**(3): 562-575.
- Buck, M., M. T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo und J. D. Gralla** (2000). "The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor." J Bacteriol **182**(15): 4129-4136.
- Bukau, B. und A. L. Horwich** (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." Cell **92**(3): 351-366.
- Burton, E., P. V. Gawande, N. Yakandawala, K. LoVetri, G. G. Zhanel, T. Romeo, A. D. Friesen und S. Madhyastha** (2006). "Antibiofilm activity of GlmU enzyme inhibitors against catheter-associated uropathogens." Antimicrob. Agents Chemother. **50**(5): 1835-1840.
- Casadaban, M. J.** (1976). "Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu." J Mol Biol **104**(3): 541-555.
- Castano, I. und F. Bastarrachea** (1984). "*glnF-lacZ* fusions in *Escherichia coli*: studies on *glnF* expression and its chromosomal orientation." Mol Gen Genet **195**(1-2): 228-233.
- Celesnik, H., A. Deana und J. G. Belasco** (2007). "Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5' pyrophosphate removal." Mol Cell **27**(1): 79-90.
- Ceyssens, P. J., K. Hertveldt, H. W. Ackermann, J. P. Noben, M. Demeke, G. Volckaert und R. Lavigne** (2008). "The intron-containing genome of the lytic *Pseudomonas* phage LUZ24 resembles the temperate phage PaP3." Virology **377**(2): 233-238.
- Chmara, H., H. Zahner, E. Borowski und S. Milewski** (1984). "Inhibition of glucosamine-6-phosphate synthetase from bacteria by anticapsin." J Antibiot (Tokyo) **37**(6): 652-658.
- Christie, G. E., P. J. Farnham und T. Platt** (1981). "Synthetic sites for transcription termination and a functional comparison with tryptophan operon termination sites in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(7): 4180-4184.
- Chuang, S. E., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, D. L. Daniels und F. R. Blattner** (1993). "Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the *hslTS/ibpAB* and *hslVU* operons in *Escherichia coli*." Gene **134**(1): 1-6.
- Cochrane, J. C. und S. A. Strobel** (2008). "Catalytic strategies of self-cleaving ribozymes." Acc Chem Res **41**(8): 1027-1035.
- Collins, J. A., I. Irnov, S. Baker und W. C. Winkler** (2007). "Mechanism of mRNA destabilization by the *glmS* ribozyme." Genes Dev. **21**(24): 3356-3368.

- Condon, C.** (2003). "RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*." Microbiol Mol Biol Rev **67**(2): 157-174, table of contents.
- Crooks, G. E., G. Hon, J. M. Chandonia und S. E. Brenner** (2004). "WebLogo: a sequence logo generator." Genome Res **14**(6): 1188-1190.
- Danese, P. N. und T. J. Silhavy** (1998). "CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon." J Bacteriol **180**(4): 831-839.
- Datsenko, K. A. und B. L. Wanner** (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **97**(12): 6640-6645.
- Deana, A. und J. G. Belasco** (2005). "Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay." Genes Dev **19**(21): 2526-2533.
- Deeley, M. C. und C. Yanofsky** (1981). "Nucleotide sequence of the structural gene for tryptophanase of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **147**(3): 787-796.
- DeLisa, M. P., C. F. Wu, L. Wang, J. J. Valdes und W. E. Bentley** (2001). "DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*." J Bacteriol **183**(18): 5239-5247.
- Deutscher, J., C. Francke und P. W. Postma** (2006). "How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **70**(4): 939-1031.
- DiGiuseppe, P. A. und T. J. Silhavy** (2003). "Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system." J Bacteriol **185**(8): 2432-2440.
- Diwa, A., A. L. Bricker, C. Jain und J. G. Belasco** (2000). "An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs feedback regulation of RNase E gene expression." Genes Dev. **14**(10): 1249-1260.
- Domka, J., J. Lee und T. K. Wood** (2006). "YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling." Appl Environ Microbiol **72**(4): 2449-2459.
- Edwards, R. M. und M. D. Yudkin** (1982). "Location of the gene for the low-affinity tryptophan-specific permease of *Escherichia coli*." Biochem J **204**(2): 617-619.
- Egan, S. M. und R. F. Schleif** (1993). "A regulatory cascade in the induction of *rhaBAD*." J Mol Biol **234**(1): 87-98.
- Eguchi, Y., T. Okada, S. Minagawa, T. Oshima, H. Mori, K. Yamamoto, A. Ishihama und R. Utsumi** (2004). "Signal transduction cascade between EvgA/EvgS and PhoP/PhoQ two-component systems of *Escherichia coli*." J Bacteriol **186**(10): 3006-3014.

- Eichler, K., A. Buchet, R. Lemke, H. P. Kleber und M. A. Mandrand-Berthelot** (1996). "Identification and characterization of the *caiF* gene encoding a potential transcriptional activator of carnitine metabolism in *Escherichia coli*." J Bacteriol **178**(5): 1248-1257.
- El Qaidi, S., F. Allemand, J. Oberto und J. Plumbridge** (2008). "Repression of galP, the galactose transporter in *Escherichia coli*, requires the specific regulator of N-acetylglucosamine metabolism." Mol Microbiol.
- Erickson, J. W. und C. A. Gross** (1989). "Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression." Genes Dev **3**(9): 1462-1471.
- Fayet, O., T. Ziegelhoffer und C. Georgopoulos** (1989). "The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures." J Bacteriol **171**(3): 1379-1385.
- Frirdich, E., B. Lindner, O. Holst und C. Whitfield** (2003). "Overexpression of the *waaZ* gene leads to modification of the structure of the inner core region of *Escherichia coli* lipopolysaccharide, truncation of the outer core, and reduction of the amount of O polysaccharide on the cell surface." J Bacteriol **185**(5): 1659-1671.
- Gaitanaris, G. A., A. Vysokanov, S. C. Hung, M. E. Gottesman und A. Gragerov** (1994). "Successive action of *Escherichia coli* chaperones *in vivo*." Mol Microbiol **14**(5): 861-869.
- Galinier, A., J. P. Lavergne, C. Geourjon, S. Fieulaine, S. Nessler und J. M. Jault** (2002). "A new family of phosphotransferases with a P-loop motif." J Biol Chem **277**(13): 11362-11367.
- Ganduri, Y. L., S. R. Sadda, M. W. Datta, R. K. Jambukeswaran und P. Datta** (1993). "TdcA, a transcriptional activator of the *tdcABC* operon of *Escherichia coli*, is a member of the LysR family of proteins." Mol Gen Genet **240**(3): 395-402.
- Garner, M. M. und A. Revzin** (1981). "A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system." Nucleic Acids Res **9**(13): 3047-3060.
- Geanacopoulos, M. und S. Adhya** (1997). "Functional characterization of roles of GalR and GalS as regulators of the *gal* regulon." J Bacteriol **179**(1): 228-234.
- Gerdes, S. Y., M. D. Scholle, J. W. Campbell, G. Balazsi, E. Ravasz, M. D. Daugherty, A. L. Somera, N. C. Kyrpides, I. Anderson, M. S. Gelfand, A. Bhattacharya, V. Kapatral, M. D'Souza, M. V. Baev, Y. Grechkin, F. Mseeh, M. Y. Fonstein, R. Overbeek, A. L. Barabasi, Z. N. Oltvai und A. L. Osterman** (2003). "Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655." J Bacteriol **185**(19): 5673-5684.

- Gerhart, J. C. und A. B. Pardee** (1962). "The enzymology of control by feedback inhibition." J Biol Chem **237**: 891-896.
- Gimenez, R., M. F. Nunez, J. Badia, J. Aguilar und L. Baldoma** (2003). "The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*." J Bacteriol **185**(21): 6448-6455.
- GOA** (2000). "Gene Ontology annotation based on Swiss-Prot keyword mapping."
- GOA, DDB, FB, MGI, ZFIN** (2001). "Gene Ontology annotation through association of InterPro records with GO terms."
- Goeddel, D. V., H. L. Heyneker, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itakura, D. G. Yansura, M. J. Ross, G. Miozzari, R. Crea und P. H. Seeburg** (1979). "Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone." Nature **281**(5732): 544-548.
- Goldberg, A. L., T. N. Akopian, A. F. Kisselev, D. H. Lee und M. Rohrwild** (1997). "New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation." Biol Chem **378**(3-4): 131-140.
- Goldblum, K. und D. Apririon** (1981). "Inactivation of the ribonucleic acid-processing enzyme ribonuclease E blocks cell division." J. Bacteriol. **146**(1): 128-132.
- Gollnick, P. und C. Yanofsky** (1990). "tRNA(Trp) translation of leader peptide codon 12 and other factors that regulate expression of the tryptophanase operon." J Bacteriol **172**(6): 3100-3107.
- Görke, B., E. Foulquier und A. Galinier** (2005). "YvcK of *Bacillus subtilis* is required for a normal cell shape and for growth on Krebs cycle intermediates and substrates of the pentose phosphate pathway." Microbiology **151**: 3777-3791.
- Görke, B. und B. Rak** (1999). "Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations." Embo J. **18**(12): 3370-3379.
- Görke, B. und J. Stülke** (2008). "Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients." Nat. Rev. Microbiol. **6**: 613-624.
- Görke, B. und J. Vogel** (2008). "Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars." Genes Dev. **22**(21): 2914-2925.
- Gottesman, S.** (2002). "Stealth regulation: biological circuits with small RNA switches." Genes Dev **16**(22): 2829-2842.
- Gottesman, S.** (2004). "The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms." Annu. Rev. Microbiol. **58**: 303-328.
- Gottesman, S.** (2005). "Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria." Trends Genet **21**(7): 399-404.



- Gottesman, S., W. P. Clark, V. de Crecy-Lagard und M. R. Maurizi** (1993). "ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and in vivo activities." J Biol Chem **268**(30): 22618-22626.
- Gottesman, S., C. A. McCullen, M. Guillier, C. K. Vanderpool, N. Majdalani, J. Benhammou, K. M. Thompson, P. C. FitzGerald, N. A. Sowa und D. J. FitzGerald** (2006). "Small RNA regulators and the bacterial response to stress." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **71**: 1-11.
- Graf, P. C. und U. Jakob** (2002). "Redox-regulated molecular chaperones." Cell Mol Life Sci **59**(10): 1624-1631.
- Gragerov, A., E. Nudler, N. Komissarova, G. A. Gaitanaris, M. E. Gottesman und V. Nikiforov** (1992). "Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10341-10344.
- Grant, A. J., M. Farris, P. Alefounder, P. H. Williams, M. J. Woodward und C. D. O'Connor** (2003). "Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)." Mol Microbiol **48**(2): 507-521.
- Grimshaw, J. P., I. Jelesarov, R. K. Siegenthaler und P. Christen** (2003). "Thermosensor action of GrpE. The DnaK chaperone system at heat shock temperatures." J Biol Chem **278**(21): 19048-19053.
- Gruber, T. M. und C. A. Gross** (2003). "Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space." Annu Rev Microbiol **57**: 441-466.
- Guillier, M., S. Gottesman und G. Storz** (2006). "Modulating the outer membrane with small RNAs." Genes Dev **20**(17): 2338-2348.
- Guyer, C. A., D. G. Morgan und J. V. Staros** (1986). "Binding specificity of the periplasmic oligopeptide-binding protein from *Escherichia coli*." J Bacteriol **168**(2): 775-779.
- Hagewood, B. T., Y. L. Ganduri und P. Datta** (1994). "Functional analysis of the tdcABC promoter of *Escherichia coli*: roles of TdcA and TdcR." J Bacteriol **176**(20): 6214-6220.
- Hajnsdorf, E., F. Braun, J. Haugel-Nielsen und P. Regnier** (1995). "Polyadenylation destabilizes the *rpsO* mRNA of *Escherichia coli*." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **92**(9): 3973-3977.
- Hall, T. A.** (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucl. Acids. Symp. Ser. **41**: 95-98.
- Hanahan, D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.
- Hand, N. J. und T. J. Silhavy** (2003). "Null mutations in a Nudix gene, *ygdP*, implicate an alarmone response in a novel suppression of hybrid jamming." J Bacteriol **185**(22): 6530-6539.

- Hankins, J. S., C. Zappavigna, A. Prud'homme-Genereux und G. A. Mackie** (2007). "Role of RNA structure and susceptibility to RNase E in regulation of a cold shock mRNA, *cspA* mRNA." J Bacteriol **189**(12): 4353-4358.
- Harayama, S., J. Bollinger, T. Iino und G. L. Hazelbauer** (1983). "Characterization of the *mgl* operon of *Escherichia coli* by transposon mutagenesis and molecular cloning." J Bacteriol **153**(1): 408-415.
- Haslberger, T., J. Weibezahn, R. Zahn, S. Lee, F. T. Tsai, B. Bukau und A. Mogk** (2007). "M domains couple the ClpB threading motor with the DnaK chaperone activity." Mol Cell **25**(2): 247-260.
- Hayden, J. D. und S. E. Ades** (2008). "The Extracytoplasmic Stress Factor, Sigma E, Is Required to Maintain Cell Envelope Integrity in *Escherichia coli*." PLoS ONE **3**(2): e1573.
- Heinrichs, D. E., J. A. Yethon und C. Whitfield** (1998). "Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*." Mol Microbiol **30**(2): 221-232.
- Helmann, J. D.** (2002). "The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors." Adv Microb Physiol **46**: 47-110.
- Helmann, J. D. und M. J. Chamberlin** (1988). "Structure and function of bacterial sigma factors." Annu Rev Biochem **57**: 839-872.
- Herzberg, C., L. A. Weidinger, B. Dörrbecker, S. Hübner, J. Stülke und F. M. Commichau** (2007). "SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*." Proteomics **7**(22): 4032-4035.
- Herzberg, M., I. K. Kaye, W. Peti und T. K. Wood** (2006). "YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport." J Bacteriol **188**(2): 587-598.
- Hindahl, M. S., G. W. Crockford und R. E. Hancock** (1984). "Outer membrane protein NmpC of *Escherichia coli*: pore-forming properties in black lipid bilayers." J Bacteriol **159**(3): 1053-1055.
- Hmiel, S. P., M. D. Snavely, C. G. Miller und M. E. Maguire** (1986). "Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene." J Bacteriol **168**(3): 1444-1450.
- Holcroft, C. C. und S. M. Egan** (2000). "Interdependence of activation at *rhaSR* by cyclic AMP receptor protein, the RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain, and *rhaR*." J Bacteriol **182**(23): 6774-6782.
- Holliday, G. L., J. M. Thornton, A. Marquet, A. G. Smith, F. Rebeille, R. Mendel, H. L. Schubert, A. D. Lawrence und M. J. Warren** (2007). "Evolution of enzymes and pathways for the biosynthesis of cofactors." Nat Prod Rep **24**(5): 972-987.

- Honzatko, R. B., H. L. Monaco und W. N. Lipscomb** (1979). "A 3.0-Å resolution study of nucleotide complexes with aspartate carbamoyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(10): 5105-5109.
- Isupov, M. N., G. Obmolova, S. Butterworth, M. A. Badet-Denisot, B. Badet, I. Polikarpov, J. A. Littlechild und A. Teplyakov** (1996). "Substrate binding is required for assembly of the active conformation of the catalytic site in Ntn amidotransferases: evidence from the 1.8 Å crystal structure of the glutaminase domain of glucosamine 6-phosphate synthase." Structure **4**(7): 801-810.
- Jacob, F. und J. Monod** (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." J Mol Biol **3**: 318-356.
- Janaszak, A., W. Majczak, B. Nadratowska, A. Szalewska-Palasz, G. Konopa und A. Taylor** (2007). "A sigma54-dependent promoter in the regulatory region of the *Escherichia coli* *rpoH* gene." Microbiology **153**(Pt 1): 111-123.
- Jansen, J. A., T. J. McCarthy, G. A. Soukup und J. K. Soukup** (2006). "Backbone and nucleobase contacts to glucosamine-6-phosphate in the *glmS* ribozyme." Nat Struct Mol Biol **13**(6): 517-523.
- Jiang, W., Y. Hou und M. Inouye** (1997). "CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone." J Biol Chem **272**(1): 196-202.
- Jishage, M., A. Iwata, S. Ueda und A. Ishihama** (1996). "Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions." J Bacteriol **178**(18): 5447-5451.
- Joanny, G., J. Derout, D. Brechemier-Baey, V. Labas, J. Vinh, P. Regnier und E. Hajnsdorf** (2007). "Polyadenylation of a functional mRNA controls gene expression in *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res. **35**: 2494-2502.
- Jones, D. H., F. C. Franklin und C. M. Thomas** (1994). "Molecular analysis of the operon which encodes the RNA polymerase sigma factor sigma 54 of *Escherichia coli*." Microbiology **140** ( Pt 5): 1035-1043.
- Kalamorz, F., B. Reichenbach, W. März, B. Rak und B. Görke** (2007). "Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlnS expression depends on the small RNA GlnZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*." Mol. Microbiol. **65**: 1518-1533.
- Katayama, T., T. Kubota, M. Takata, N. Akimitsu und K. Sekimizu** (1996). "Disruption of the *hslU* gene, which encodes an ATPase subunit of the eukaryotic 26S proteasome homolog in *Escherichia coli*, suppresses the temperature-sensitive dnaA46 mutation." Biochem Biophys Res Commun **229**(1): 219-224.
- Kawula, T. H. und M. J. Lelivelt** (1994). "Mutations in a gene encoding a new Hsp70 suppress rapid DNA inversion and *bgl* activation, but not *proU* derepression, in *hns-1* mutant *Escherichia coli*." J Bacteriol **176**(3): 610-619.

- Kedzierska, S., M. Staniszewska, A. Wegrzyn und A. Taylor** (1999). "The role of DnaK/DnaJ and GroEL/GroES systems in the removal of endogenous proteins aggregated by heat-shock from *Escherichia coli* cells." FEBS Lett **446**(2-3): 331-337.
- Kenig, M. und E. P. Abraham** (1976). "Antimicrobial activities and antagonists of bacilysin and anticapsin." J Gen Microbiol **94**(1): 37-45.
- Khan, M. A. und R. E. Isaacson** (1998). "In vivo expression of the beta-glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* occurs in mouse liver." J Bacteriol **180**(17): 4746-4749.
- Khemici, V. und A. J. Carpousis** (2004). "The RNA degradosome and poly(A) polymerase of *Escherichia coli* are required *in vivo* for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers." Mol. Microbiol **51**(3): 777-790.
- Kisselev, L. L., J. Justesen, A. D. Wolfson und L. Y. Frolova** (1998). "Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules?" FEBS Lett **427**(2): 157-163.
- Kitagawa, M., Y. Matsumura und T. Tsuchido** (2000). "Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett **184**(2): 165-171.
- Kitagawa, M., C. Wada, S. Yoshioka und T. Yura** (1991). "Expression of ClpB, an analog of the ATP-dependent protease regulatory subunit in *Escherichia coli*, is controlled by a heat shock sigma factor (sigma 32)." J Bacteriol **173**(14): 4247-4253.
- Klena, J. D., E. Pradel und C. A. Schnaitman** (1992). "Comparison of lipopolysaccharide biosynthesis genes *rfaK*, *rfaL*, *rfaY*, and *rfaZ* of *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **174**(14): 4746-4752.
- Korber, P., J. M. Stahl, K. H. Nierhaus und J. C. Bardwell** (2000). "Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein." Embo J **19**(4): 741-748.
- Korber, P., T. Zander, D. Herschlag und J. C. Bardwell** (1999). "A new heat shock protein that binds nucleic acids." J Biol Chem **274**(1): 249-256.
- Kozak, M.** (2005). "Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes." Gene **361**: 13-37.
- Kuczynska-Wisnik, D., S. Kedzierska, E. Matuszewska, P. Lund, A. Taylor, B. Lipinska und E. Laskowska** (2002). "The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock." Microbiology **148**(Pt 6): 1757-1765.
- Kushner, S. R.** (2007). Messenger RNA Decay. Web module 4.6.4. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Web edition. G. Björk, American Society for Microbiology.
- Kwon, A. R., B. M. Kessler, H. S. Overkleeft und D. B. McKay** (2003). "Structure and reactivity of an asymmetric complex between HslV and I-domain deleted HslU, a prokaryotic homolog of the eukaryotic proteasome." J Mol Biol **330**(2): 185-195.

- La Teana, A., A. Brandi, M. Falconi, R. Spurio, C. L. Pon und C. O. Gualerzi** (1991). "Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10907-10911.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson und D. G. Higgins** (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics **23**(21): 2947-2948.
- Laskowska, E., D. Kuczynska-Wisnik, J. Skorko-Glonek und A. Taylor** (1996a). "Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated in vivo by heat shock; HtrA protease action in vivo and in vitro." Mol Microbiol **22**(3): 555-571.
- Laskowska, E., A. Wawrzynow und A. Taylor** (1996b). "IbpA and IbpB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock." Biochimie **78**(2): 117-122.
- Lease, R. A., M. E. Cusick und M. Belfort** (1998). "Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12456-12461.
- Lee, C. R., S. H. Cho, M. J. Yoon, A. Peterkofsky und Y. J. Seok** (2007). "*Escherichia coli* enzyme IIA<sup>Ntr</sup> regulates the K<sup>+</sup> transporter TrkA." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **104**(10): 4124-4129.
- Lee, C. R., B. M. Koo, S. H. Cho, Y. J. Kim, M. J. Yoon, A. Peterkofsky und Y. J. Seok** (2005). "Requirement of the dephospho-form of enzyme IIA<sup>Ntr</sup> for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression." Mol. Microbiol. **58**(1): 334-344.
- Levin, H. L. und H. K. Schachman** (1985). "Regulation of aspartate transcarbamoylase synthesis in *Escherichia coli*: analysis of deletion mutations in the promoter region of the *pyrBI* operon." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(14): 4643-4647.
- Liberek, K., J. Marszalek, D. Ang, C. Georgopoulos und M. Zylicz** (1991). "*Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2874-2878.
- Linton, K. J. und C. F. Higgins** (1998). "The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins." Mol Microbiol **28**(1): 5-13.
- Madhusudan, S., A. Paukner, Y. Klingen und K. Schnetz** (2005). "Independent regulation of H-NS-mediated silencing of the *bgl* operon at two levels: upstream by BglJ and LeuO and downstream by DnaKJ." Microbiology **151**(Pt 10): 3349-3359.
- Madigan, M., J. Martinko und J. Parker** (2003). Brock - Biology of Microorganisms.
- Majdalani, N., D. Hernandez und S. Gottesman** (2002). "Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA." Mol Microbiol **46**(3): 813-826.

- Maki, Y., H. Yoshida und A. Wada** (2000). "Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli*." Genes Cells **5**(12): 965-974.
- Marshall, N. J., R. Andruszkiewicz, S. Gupta, S. Milewski und J. W. Payne** (2003). "Structure-activity relationships for a series of peptidomimetic antimicrobial prodrugs containing glutamine analogues." J. Antimicrob. Chemother. **51**(4): 821-831.
- McCarthy, T. J., M. A. Plog, S. A. Floy, J. A. Jansen, J. K. Soukup und G. A. Soukup** (2005). "Ligand requirements for glmS ribozyme self-cleavage." Chem Biol **12**(11): 1221-1226.
- Mengin-Lecreux, D. und J. van Heijenoort** (1993). "Identification of the *glmU* gene encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **175**(19): 6150-6157.
- Mengin-Lecreux, D. und J. van Heijenoort** (1994). "Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the *glmU* gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis." J. Bacteriol. **176**(18): 5788-5795.
- Mengin-Lecreux, D. und J. van Heijenoort** (1996). "Characterization of the essential gene *glmM* encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*." J. Biol. Chem. **271**(1): 32-39.
- Merrick, M. J.** (1993). "In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N)." Mol. Microbiol. **10**(5): 903-909.
- Midelfort, C. F. und I. A. Rose** (1977). "Studies on the mechanism of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate isomerase." Biochemistry **16**(8): 1590-1596.
- Mikulecky, P. J., M. K. Kaw, C. C. Brescia, J. C. Takach, D. D. Sledjeski und A. L. Feig** (2004). "*Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs." Nat Struct Mol Biol **11**(12): 1206-1214.
- Milewski, S.** (2002). "Glucosamine-6-phosphate synthase--the multi-facets enzyme." Biochim. Biophys. Acta. **1597**(2): 173-192.
- Milewski, S., R. Andruszkiewicz, L. Kasprzak, J. Mazerski, F. Mignini und E. Borowski** (1991). "Mechanism of action of anticandidal dipeptides containing inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase." Antimicrob Agents Chemother **35**(1): 36-43.
- Miller, J. H.** (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Minagawa, S., H. Ogasawara, A. Kato, K. Yamamoto, Y. Eguchi, T. Oshima, H. Mori, A. Ishihama und R. Utsumi** (2003). "Identification and molecular characterization of the Mg<sup>2+</sup> stimulon of *Escherichia coli*." J Bacteriol **185**(13): 3696-3702.

- Mizushima, T., Y. Ohtsuka, H. Mori, T. Miki und K. Sekimizu** (1996). "Increase in synthesis and stability of sigma 32 on treatment with inhibitors of DNA gyrase in *Escherichia coli*." Mol Gen Genet **253**(3): 297-302.
- Mogk, A. und B. Bukau** (2004). "Molecular chaperones: structure of a protein disaggregase." Curr Biol **14**(2): R78-80.
- Mogk, A., E. Deuerling, S. Vorderwulbecke, E. Vierling und B. Bukau** (2003a). "Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation." Mol Microbiol **50**(2): 585-595.
- Mogk, A., C. Schlieker, C. Strub, W. Rist, J. Weibezahn und B. Bukau** (2003b). "Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity." J Biol Chem **278**(20): 17615-17624.
- Mohanty, B. K., V. F. Maples und S. R. Kushner** (2004). "The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **54**(4): 905-920.
- Moller, A. K., M. P. Leatham, T. Conway, P. J. Nuijten, L. A. de Haan, K. A. Krogfelt und P. S. Cohen** (2003). "An *Escherichia coli* MG1655 lipopolysaccharide deep-rough core mutant grows and survives in mouse cecal mucus but fails to colonize the mouse large intestine." Infect Immun **71**(4): 2142-2152.
- Møller, T., T. Franch, P. Hojrup, D. R. Keene, H. P. Bachinger, R. G. Brennan und P. Valentin-Hansen** (2002). "Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction." Mol. Cell **9**(1): 23-30.
- Moller, T., T. Franch, C. Udesen, K. Gerdes und P. Valentin-Hansen** (2002). "Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon." Genes Dev **16**(13): 1696-1706.
- Moralejo, P., S. M. Egan, E. Hidalgo und J. Aguilar** (1993). "Sequencing and characterization of a gene cluster encoding the enzymes for L-rhamnose metabolism in *Escherichia coli*." J Bacteriol **175**(17): 5585-5594.
- Morita, M., M. Kanemori, H. Yanagi und T. Yura** (1999). "Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure." J Bacteriol **181**(2): 401-410.
- Morita, T. und H. Aiba** (2006). "[RNA silencing mediated by small RNAs in *Escherichia coli*]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **51**(16 Suppl): 2478-2483.
- Morita, T., K. Maki und H. Aiba** (2005). "RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs." Genes Dev. **19**(18): 2176-2186.
- Moulleron, S., M. A. Badet-Denisot und B. Golinelli-Pimpaneau** (2006). "Glutamine binding opens the ammonia channel and activates glucosamine-6P synthase." J Biol Chem **281**(7): 4404-4412.

- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich** (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Murooka, Y., T. Higashiura und T. Harada** (1978). "Genetic mapping of tyramine oxidase and arylsulfatase genes and their regulation in intergeneric hybrids of enteric bacteria." J Bacteriol **136**(2): 714-722.
- Neidhardt, F. C., I. R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low Jr, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umberger** (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Nishii, W., T. Suzuki, M. Nakada, Y. T. Kim, T. Muramatsu und K. Takahashi** (2005). "Cleavage mechanism of ATP-dependent Lon protease toward ribosomal S2 protein." FEBS Lett **579**(30): 6846-6850.
- Notley-McRobb, L., S. Seeto und T. Ferenci** (2002). "Enrichment and elimination of mutY mutators in *Escherichia coli* populations." Genetics **162**(3): 1055-1062.
- Opdyke, J. A., J. G. Kang und G. Storz** (2004). "GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*." J Bacteriol **186**(20): 6698-6705.
- Pardee, A. B. und R. A. Yates** (1956). "Pyrimidine biosynthesis in *Escherichia coli*." J Biol Chem **221**(2): 743-756.
- Parkinson, J. S.** (1993). "Signal transduction schemes of bacteria." Cell **73**(5): 857-871.
- Pearce, S. R., M. L. Mimmack, M. P. Gallagher, U. Gileadi, S. C. Hyde und C. F. Higgins** (1992). "Membrane topology of the integral membrane components, OppB and OppC, of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*." Mol Microbiol **6**(1): 47-57.
- Perez-Rueda, E., J. Collado-Vides und L. Segovia** (2004). "Phylogenetic distribution of DNA-binding transcription factors in bacteria and archaea." Comput Biol Chem **28**(5-6): 341-350.
- Pfennig, P. L. und A. M. Flower** (2001). "BipA is required for growth of *Escherichia coli* K12 at low temperature." Mol Genet Genomics **266**(2): 313-317.
- Plumbridge, J.** (1995). "Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the *glmUS* operon and requires two separated NagC binding sites." Embo J. **14**(16): 3958-3965.
- Plumbridge, J. und A. Kolb** (1991). "CAP and Nag repressor binding to the regulatory regions of the *nagE-B* and *manX* genes of *Escherichia coli*." J. Mol. Biol. **217**(4): 661-679.



- Plumbridge, J. und O. Pellegrini** (2004). "Expression of the chitobiose operon of *Escherichia coli* is regulated by three transcription factors: NagC, ChbR and CAP." Mol. Microbiol. **52**(2): 437-449.
- Plumbridge, J. und E. Vimr** (1999). "Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **181**(1): 47-54.
- Plumbridge, J. A.** (1991). "Repression and induction of the *nag* regulon of *Escherichia coli* K-12: the roles of *nagC* and *nagA* in maintenance of the uninduced state." Mol. Microbiol. **5**(8): 2053-2062.
- Plumbridge, J. A., O. Cochet, J. M. Souza, M. M. Altamirano, M. L. Calcagno und B. Badet** (1993). "Coordinated regulation of amino sugar-synthesizing and -degrading enzymes in *Escherichia coli* K-12." J. Bacteriol. **175**(16): 4951-4956.
- Postma, P. W., J. W. Lengeler und G. R. Jacobson** (1993). "Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria." Microbiol. Rev. **57**(3): 543-594.
- Powell, B. S., D. L. Court, T. Inada, Y. Nakamura, V. Michotey, X. Cui, A. Reizer, M. H. Saier, Jr. und J. Reizer** (1995). "Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIA<sup>Ntr</sup> affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant." J. Biol. Chem. **270**(9): 4822-4839.
- Prevost, K., H. Salvail, G. Desnoyers, J. F. Jacques, E. Phaneuf und E. Masse** (2007). "The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis." Mol Microbiol **64**(5): 1260-1273.
- Pruss, B. M., X. Liu, W. Hendrickson und P. Matsumura** (2001). "FlhD/FlhC-regulated promoters analyzed by gene array and *lacZ* gene fusions." FEMS Microbiol Lett **197**(1): 91-97.
- Pugsley, A. P. und C. A. Schnaitman** (1978). "Outer membrane proteins of *Escherichia coli*. VII. Evidence that bacteriophage-directed protein 2 functions as a pore." J Bacteriol **133**(3): 1181-1189.
- Rabus, R., J. Reizer, I. Paulsen und M. H. Saier, Jr.** (1999). "Enzyme I<sup>Ntr</sup> from *Escherichia coli*. A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr." J. Biol. Chem. **274**(37): 26185-26191.
- Raivio, T. L.** (2005). "Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis." Mol Microbiol **56**(5): 1119-1128.
- Raivio, T. L., D. L. Popkin und T. J. Silhavy** (1999). "The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition." J Bacteriol **181**(17): 5263-5272.

- Ray, P., R. J. Hall, R. D. Finn, S. Chen, A. Patwardhan, M. Buck und M. van Heel** (2005). "Conformational changes of *Escherichia coli* sigma54-RNA-polymerase upon closed-promoter complex formation." J Mol Biol **354**(2): 201-205.
- Reed, J. L., T. R. Patel, K. H. Chen, A. R. Joyce, M. K. Applebee, C. D. Herring, O. T. Bui, E. M. Knight, S. S. Fong und B. O. Palsson** (2006). "Systems approach to refining genome annotation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17480-17484.
- Reichenbach, B., A. Maes, F. Kalamorz, E. Hajnsdorf und B. Görke** (2008). "The small RNA GlmY acts upstream of the sRNA GlmZ in the activation of *glmS* expression and is subject to regulation by polyadenylation in *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res. **36**(8): 2570-2580.
- Reitzer, L.** (2003). "Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*." Annu Rev Microbiol **57**: 155-176.
- Reitzer, L. und B. L. Schneider** (2001). "Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**(3): 422-444.
- Reitzer, L. J. und B. Magasanik** (1985). "Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(7): 1979-1983.
- Reitzer, L. J. und B. Magasanik** (1986). "Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter." Cell **45**(6): 785-792.
- Reizer, J., V. Michotey, A. Reizer und M. H. Saier, Jr.** (1994a). "Novel phosphotransferase system genes revealed by bacterial genome analysis: unique, putative fructose- and glucoside-specific systems." Protein Sci **3**(3): 440-450.
- Reizer, J., A. Reizer und M. H. Saier, Jr.** (1994b). "A functional superfamily of sodium/solute symporters." Biochim Biophys Acta **1197**(2): 133-166.
- Reizer, J., A. Reizer, M. H. Saier, Jr. und G. R. Jacobson** (1992). "A proposed link between nitrogen and carbon metabolism involving protein phosphorylation in bacteria." Protein Sci **1**(6): 722-726.
- Ren, D., L. A. Bedzyk, S. M. Thomas, R. W. Ye und T. K. Wood** (2004). "Gene expression in *Escherichia coli* biofilms." Appl Microbiol Biotechnol **64**(4): 515-524.
- Reynolds, A. E., S. Mahadevan, S. F. LeGrice und A. Wright** (1986). "Enhancement of bacterial gene expression by insertion elements or by mutation in a CAP-cAMP binding site." J Mol Biol **191**(1): 85-95.
- Rhodijs, V. A., W. C. Suh, G. Nonaka, J. West und C. A. Gross** (2006). "Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes." PLoS Biol **4**(1): e2.
- Rice, P. W., D. A. Polayes und J. E. Dahlberg** (1987). "Spot 42 RNA of *Escherichia coli* is not an mRNA." J Bacteriol **169**(8): 3850-3852.

- Rippe, K., M. Guthold, P. H. von Hippel und C. Bustamante** (1997). "Transcriptional activation via DNA-looping: visualization of intermediates in the activation pathway of *E. coli* RNA polymerase  $\sigma$  54 holoenzyme by scanning force microscopy." J Mol Biol **270**(2): 125-138.
- Rivas, E., R. J. Klein, T. A. Jones und S. R. Eddy** (2001). "Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics." Curr Biol **11**(17): 1369-1373.
- Robbins, J. C. und D. L. Oxender** (1973). "Transport systems for alanine, serine, and glycine in *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **116**(1): 12-18.
- Rohrwild, M., O. Coux, H. C. Huang, R. P. Moerschell, S. J. Yoo, J. H. Seol, C. H. Chung und A. L. Goldberg** (1996). "HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5808-5813.
- Rosen, R., D. Biran, E. Gur, D. Becher, M. Hecker und E. Z. Ron** (2002). "Protein aggregation in *Escherichia coli*: role of proteases." FEMS Microbiol Lett **207**(1): 9-12.
- Sambrook, J. und D. Russell** (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson** (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Saraste, M., P. R. Sibbald und A. Wittinghofer** (1990). "The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins." Trends Biochem Sci **15**(11): 430-434.
- Sasse-Dwight, S. und J. D. Gralla** (1990). "Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor sigma 54." Cell **62**(5): 945-954.
- Saurin, W., M. Hofnung und E. Dassa** (1999). "Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters." J Mol Evol **48**(1): 22-41.
- Schnetz, K. und B. Rak** (1992). "IS5: a mobile enhancer of transcription in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(4): 1244-1248.
- Schnetz, K., C. Toloczyki und B. Rak** (1987). "Beta-glucoside (bgl) operon of *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization, and possible evolutionary relationship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes." J Bacteriol **169**(6): 2579-2590.
- Scholle, A., J. Vreemann, V. Blank, A. Nold, W. Boos und M. D. Manson** (1987). "Sequence of the *mglB* gene from *Escherichia coli* K12: comparison of wild-type and mutant galactose chemoreceptors." Mol Gen Genet **208**(1-2): 247-253.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork und C. P. Ponting** (1998). "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 5857-5864.

- Schumacher, J., N. Joly, M. Rappas, D. Bradley, S. R. Wigneshweraraj, X. Zhang und M. Buck** (2007). "Sensor I threonine of the AAA+ ATPase transcriptional activator PspF is involved in coupling nucleotide triphosphate hydrolysis to the restructuring of sigma 54-RNA polymerase." J Biol Chem **282**(13): 9825-9833.
- Schumacher, M. A. und R. G. Brennan** (2002). "Structural mechanisms of multidrug recognition and regulation by bacterial multidrug transcription factors." Mol Microbiol **45**(4): 885-893.
- Schwartz, C. J., J. L. Giel, T. Patschkowski, C. Luther, F. J. Ruzicka, H. Beinert und P. J. Kiley** (2001). "IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14895-14900.
- Seol, J. H., S. K. Woo, E. M. Jung, S. J. Yoo, C. S. Lee, K. J. Kim, K. Tanaka, A. Ichihara, D. B. Ha und C. H. Chung** (1991). "Protease Do is essential for survival of *Escherichia coli* at high temperatures: its identity with the htrA gene product." Biochem Biophys Res Commun **176**(2): 730-736.
- Serres, M. H., S. Gopal, L. A. Nahum, P. Liang, T. Gaasterland und M. Riley** (2001). "A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome." Genome Biol **2**(9): RESEARCH0035.
- Seshasayee, A. S., P. Bertone, G. M. Fraser und N. M. Luscombe** (2006). "Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses." Curr Opin Microbiol **9**(5): 511-519.
- Sharp, J. S. und D. H. Bechhofer** (2003). "Effect of translational signals on mRNA decay in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **185**(18): 5372-5379.
- Sherman, M. und A. L. Goldberg** (1992). "Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*." Embo J **11**(1): 71-77.
- Shiau, S. P., P. Chen und L. J. Reitzer** (1993). "Effects of insertions and deletions in glnG (ntrC) of *Escherichia coli* on nitrogen regulator I-dependent DNA binding and transcriptional activation." J Bacteriol **175**(1): 190-199.
- Shimuta, T. R., K. Nakano, Y. Yamaguchi, S. Ozaki, K. Fujimitsu, C. Matsunaga, K. Noguchi, A. Emoto und T. Katayama** (2004). "Novel heat shock protein HspQ stimulates the degradation of mutant DnaA protein in *Escherichia coli*." Genes Cells **9**(12): 1151-1166.
- Slonczewski, J. L., T. N. Gonzalez, F. M. Bartholomew und N. J. Holt** (1987). "Mu d-directed *lacZ* fusions regulated by low pH in *Escherichia coli*." J Bacteriol **169**(7): 3001-3006.
- Smirnova, I. N., V. N. Kasho und L. D. Faller** (1998). "Inferences about the catalytic domain of P-type ATPases from the tertiary structures of enzymes that catalyze the same elementary reaction." FEBS Lett **431**(3): 309-314.

- Smith, R. L., J. L. Banks, M. D. Snavelly und M. E. Maguire** (1993). "Sequence and topology of the CorA magnesium transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Identification of a new class of transport protein." J Biol Chem **268**(19): 14071-14080.
- Sperandeo, P., R. Cescutti, R. Villa, C. Di Benedetto, D. Candia, G. Deho und A. Polissi** (2007). "Characterization of *lptA* and *lptB*, two essential genes implicated in lipopolysaccharide transport to the outer membrane of *Escherichia coli*." J Bacteriol **189**(1): 244-253.
- Sperandeo, P., C. Pozzi, G. Deho und A. Polissi** (2006). "Non-essential KDO biosynthesis and new essential cell envelope biogenesis genes in the *Escherichia coli* *yrbG-yhbG* locus." Res Microbiol **157**(6): 547-558.
- Spiess, C., A. Beil und M. Ehrmann** (1999). "A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein." Cell **97**(3): 339-347.
- Storz, G., S. Altuvia und K. M. Wassarman** (2005). "An abundance of RNA regulators." Annu Rev Biochem **74**: 199-217.
- Strauch, K. L. und J. Beckwith** (1988). "An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(5): 1576-1580.
- Studholme, D. J. und M. Buck** (2000). "The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in bacteria: insights from genome sequences." FEMS Microbiol Lett **186**(1): 1-9.
- Sukhodolets, M. V., J. E. Cabrera, H. Zhi und D. J. Jin** (2001). "RapA, a bacterial homolog of SWI2/SNF2, stimulates RNA polymerase recycling in transcription." Genes Dev **15**(24): 3330-3341.
- Sukhodolets, M. V. und S. Garges** (2003). "Interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the ribosomal protein S1 and the Sm-like ATPase Hfq." Biochemistry **42**(26): 8022-8034.
- Svergun, D. I., M. Malfois, M. H. Koch, S. R. Wigneshweraraj und M. Buck** (2000). "Low resolution structure of the sigma54 transcription factor revealed by X-ray solution scattering." J Biol Chem **275**(6): 4210-4214.
- Taguchi, H.** (2005). "Chaperonin GroEL meets the substrate protein as a "load" of the rings." J Biochem **137**(5): 543-549.
- Tamai, E., T. A. Belyaeva, S. J. Busby und T. Tsuchiya** (2000). "Mutations that increase the activity of the promoter of the *Escherichia coli* melibiose operon improve the binding of MelR, a transcription activator triggered by melibiose." J Biol Chem **275**(22): 17058-17063.
- Tame, J. R., G. N. Murshudov, E. J. Dodson, T. K. Neil, G. G. Dodson, C. F. Higgins und A. J. Wilkinson** (1994). "The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein." Science **264**(5165): 1578-1581.

- Teplyakov, A., C. Leriche, G. Obmolova, B. Badet und M. A. Badet-Denisot** (2002). "From Lobry de Bruyn to enzyme-catalyzed ammonia channelling: molecular studies of D-glucosamine-6P synthase." Nat Prod Rep **19**(1): 60-69.
- Teplyakov, A., G. Obmolova, M. A. Badet-Denisot, B. Badet und I. Polikarpov** (1998). "Involvement of the C terminus in intramolecular nitrogen channeling in glucosamine 6-phosphate synthase: evidence from a 1.6 Å crystal structure of the isomerase domain." Structure **6**(8): 1047-1055.
- Teplyakov, A., G. Obmolova, B. Badet und M. A. Badet-Denisot** (2001). "Channeling of ammonia in glucosamine-6-phosphate synthase." J Mol Biol **313**(5): 1093-1102.
- Terribilini, M., J. D. Sander, J. H. Lee, P. Zaback, R. L. Jernigan, V. Honavar und D. Dobbs** (2007). "RNABindR: a server for analyzing and predicting RNA-binding sites in proteins." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W578-584.
- Thoden, J. B., X. Huang, F. M. Raushel und H. M. Holden** (1999). "The small subunit of carbamoyl phosphate synthetase: snapshots along the reaction pathway." Biochemistry **38**(49): 16158-16166.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins und T. J. Gibson** (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-4680.
- Tinsley, R. A., J. R. Furchak und N. G. Walter** (2007). "Trans-acting *glmS* catalytic riboswitch: locked and loaded." RNA **13**(4): 468-477.
- Tsui, H. C., H. C. Leung und M. E. Winkler** (1994). "Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12." Mol. Microbiol. **13**(1): 35-49.
- Turnbough, C. L., Jr., K. L. Hicks und J. P. Donahue** (1983). "Attenuation control of pyrBI operon expression in *Escherichia coli* K-12." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(2): 368-372.
- Urban, J. H., K. Papenfort, J. Thomsen, R. A. Schmitz und J. Vogel** (2007). "A conserved small RNA promotes discoordinate expression of the *glmUS* operon mRNA to activate GlmS synthesis." J. Mol. Biol. **373**: 521-528.
- Urban, J. H. und J. Vogel** (2008). "Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate *glmS* mRNA translation." PLoS Biol. **6**(3): e64.
- VanBogelen, R. A., P. M. Kelley und F. C. Neidhardt** (1987). "Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*." J Bacteriol **169**(1): 26-32.
- Vassilieva, I. M., M. V. Rouzanov, N. V. Zelinskaya, I. Moll, U. Blasi und M. B. Garber** (2002). "Cloning, purification, and crystallization of a bacterial gene expression regulator--Hfq protein from *Escherichia coli*." Biochemistry (Mosc) **67**(11): 1293-1297.

- Via, P., J. Badia, L. Baldoma, N. Obradors und J. Aguilar** (1996). "Transcriptional regulation of the *Escherichia coli rhaT* gene." Microbiology **142** ( Pt 7): 1833-1840.
- Viegas, S. C., V. Pfeiffer, A. Sittka, I. J. Silva, J. Vogel und C. M. Arraiano** (2007). "Characterization of the role of ribonucleases in *Salmonella* small RNA decay." Nucleic Acids Res. **35**(22): 7651-7664.
- Vijayalakshmi, J., M. K. Mukherjee, J. Graumann, U. Jakob und M. A. Saper** (2001). "The 2.2 Å crystal structure of Hsp33: a heat shock protein with redox-regulated chaperone activity." Structure **9**(5): 367-375.
- Wagner, E. G., S. Altuvia und P. Romby** (2002). "Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements." Adv Genet **46**: 361-398.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick und N. J. Gay** (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." Embo J **1**(8): 945-951.
- Wall, D., M. Zylicz und C. Georgopoulos** (1994). "The NH<sub>2</sub>-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication." J Biol Chem **269**(7): 5446-5451.
- Wang, Q. P. und J. M. Kaguni** (1989). "A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*." J Bacteriol **171**(8): 4248-4253.
- Wassarman, K. M., F. Repoila, C. Rosenow, G. Storz und S. Gottesman** (2001). "Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays." Genes Dev. **15**(13): 1637-1651.
- White, R. J.** (1968). "Control of amino sugar metabolism in *Escherichia coli* and isolation of mutants unable to degrade amino sugars." Biochem J **106**(4): 847-858.
- White, S., F. E. Tuttle, D. Blankenhorn, D. C. Dosch und J. L. Slonczewski** (1992). "pH dependence and gene structure of *inaA* in *Escherichia coli*." J Bacteriol **174**(5): 1537-1543.
- Wickstrum, J. R., T. J. Santangelo und S. M. Egan** (2005). "Cyclic AMP receptor protein and RhaR synergistically activate transcription from the L-rhamnose-responsive *rhaSR* promoter in *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(19): 6708-6718.
- Wigneshweraraj, S., D. Bose, P. C. Burrows, N. Joly, J. Schumacher, M. Rappas, T. Pape, X. Zhang, P. Stockley, K. Severinov und M. Buck** (2008). "Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the sigma54 promoter-specificity factor." Mol Microbiol **68**(3): 538-546.
- Wilusz, C. J. und J. Wilusz** (2005). "Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria." Nat Struct Mol Biol **12**(12): 1031-1036.
- Winkler, W. C., A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins und R. R. Breaker** (2004). "Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme." Nature **428**(6980): 281-286.

- Wissenbach, U., S. Six, J. Bongaerts, D. Ternes, S. Steinwachs und G. Uden** (1995). "A third periplasmic transport system for L-arginine in *Escherichia coli*: molecular characterization of the *artPIQMJ* genes, arginine binding and transport." Mol Microbiol **17**(4): 675-686.
- Wong, C., Y. Tintut und J. D. Gralla** (1994). "The domain structure of sigma 54 as determined by analysis of a set of deletion mutants." J Mol Biol **236**(1): 81-90.
- Wosten, M. M.** (1998). "Eubacterial sigma-factors." FEMS Microbiol Rev **22**(3): 127-150.
- Wu, L. F. und M. A. Mandrand-Berthelot** (1995). "A family of homologous substrate-binding proteins with a broad range of substrate specificity and dissimilar biological functions." Biochimie **77**(9): 744-750.
- Xu, F., S. Lin-Chao und S. N. Cohen** (1993). "The *Escherichia coli* *pcnB* gene promotes adenylation of antisense RNAI of ColE1-type plasmids *in vivo* and degradation of RNAI decay intermediates." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **90**(14): 6756-6760.
- Yanofsky, C., V. Horn und P. Gollnick** (1991). "Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*." J Bacteriol **173**(19): 6009-6017.
- Yethon, J. A., D. E. Heinrichs, M. A. Monteiro, M. B. Perry und C. Whitfield** (1998). "Involvement of *waaY*, *waaQ*, and *waaP* in the modification of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane." J Biol Chem **273**(41): 26310-26316.
- Yu, D. und D. L. Court** (1998). "A new system to place single copies of genes, sites and *lacZ* fusions on the *Escherichia coli* chromosome." Gene **223**(1-2): 77-81.
- Zhai, Y. und M. H. Saier, Jr.** (2002). "The beta-barrel finder (BBF) program, allowing identification of outer membrane beta-barrel proteins encoded within prokaryotic genomes." Protein Sci **11**(9): 2196-2207.
- Zhang, A., S. Altuvia, A. Tiwari, L. Argaman, R. Hengge-Aronis und G. Storz** (1998). "The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein." Embo J **17**(20): 6061-6068.
- Zhang, L., K. Zuo, F. Zhang, Y. Cao, J. Wang, Y. Zhang, X. Sun und K. Tang** (2006). "Conservation of noncoding microsatellites in plants: implication for gene regulation." BMC Genomics **7**: 323.
- Zhang, X., M. Chaney, S. R. Wigneshweraraj, J. Schumacher, P. Bordes, W. Cannon und M. Buck** (2002). "Mechanochemical ATPases and transcriptional activation." Mol Microbiol **45**(4): 895-903.
- Zuker, M.** (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." Nucleic Acids Res. **31**(13): 3406-3415.



## 7. Anhang

### 7.1. Stämme

Name	Beschreibung	Referenz/Quelle
AM111	MC4100 <i>hfq1::omega</i>	(Tsui <i>et al.</i> 1994)
AM112	MC4100 <i>hfq2::omega</i>	(Tsui <i>et al.</i> 1994)
DH5 $\alpha$	$\phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	(Sambrook und Russell 2001)
IBPC750	IBPC5321 $\Delta$ <i>glmS::tc thi-1 argG6 argE3 his-4 xyl-5 rpsL</i> $\Delta$ <i>lacX74 mlc delta glmS::tc</i>	(Plumbridge und Vimr 1999)
IBPC 5321	<i>thi-1 argG6 argE3 his-4 xyl-5 rpsL</i> $\Delta$ <i>lacX74 mlc</i> $\Delta$ <i>glmS::tc</i>	(Plumbridge und Kolb 1991)
JVS8018	<i>E. coli</i> MC4100 $\Delta$ <i>yhbJ::kan</i>	(Urban und Vogel 2008)
MC4100	F <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> )U169* <i>rspL150 relA1 flbB5301 fruA25<math>\ddagger</math> deoC1 ptsF25 e14-</i>	(Casadaban 1976)
N3431	<i>lacZ43 (Fs)</i> , <i>rne-3071(ts)</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i> , <i>thi-1</i>	(Goldblum und Apririon 1981)
N3433	<i>lacZ43 (Fs)</i> , <i>rne+</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i> , <i>thi-1</i>	(Goldblum und Apririon 1981)
R1279	$\Delta$ ( <i>pho-bgl</i> )201 $\Delta$ ( <i>lac-pro</i> ) <i>ara thi</i>	(Görke und Rak 1999)
R2260	R1279 $\Delta$ ( <i>ptsH ptsI crr</i> ):: <i>neo</i>	Laborsammlung B. Görke, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen
R2404	R1279 $\Delta$ <i>ptsP</i>	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
R2409	R1279 $\Delta$ <i>ptsP</i> , $\Delta$ ( <i>ptsH ptsI crr</i> ):: <i>neo</i>	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
R2413	R1279 $\Delta$ <i>ptsN-npr</i>	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
R2415	R1279 $\Delta$ <i>ptsN-npr</i> $\Delta$ ( <i>ptsH ptsI crr</i> ):: <i>neo</i>	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
W3110	F $\lambda$ IN( <i>rrnD-rrnE</i> )I	(Bachmann 1972)
Z2	$\Delta$ ( <i>ptsN-npr</i> ) $\Delta$ ( <i>pho-bgl</i> )201 $\Delta$ ( <i>lac-pro</i> ) <i>ara thi</i> , <i>strp<sup>R</sup> F' lac<sup>q</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>lacY<sup>+</sup> pro<sup>+</sup></i>	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z3	$\Delta$ ( <i>pho-bgl</i> )201 $\Delta$ ( <i>lac-pro</i> ) <i>ara thi</i> , <i>strp<sup>R</sup> F' lac<sup>q</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>lacY<sup>+</sup> pro<sup>+</sup></i>	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z5	$\Delta$ ( <i>ptsN-npr</i> ) $\Delta$ ( <i>pho-bgl</i> )201 $\Delta$ ( <i>lac-pro</i> ) <i>ara thi</i> , <i>strp<sup>R</sup> F' lac<sup>q</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>lacY<sup>+</sup> pro<sup>+</sup> attB::[glmS-5'-lacZ (glmS -311 to +129) aadA (spec<sup>R</sup>)]</i>	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z6	$\Delta$ ( <i>ptsN-npr</i> ) $\Delta$ ( <i>pho-bgl</i> )201 $\Delta$ ( <i>lac-pro</i> ) <i>ara thi</i> , <i>strp<sup>R</sup> F' lac<sup>q</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>lacY<sup>+</sup> pro<sup>+</sup> attB::[ glmU-5'-glmU-glmS-5'-lacZ (glmU -392 to glmS +129) aadA (spec<sup>R</sup>)]</i>	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z8	$\Delta$ ( <i>pho-bgl</i> )201 $\Delta$ ( <i>lac-pro</i> ) <i>ara thi</i> , <i>strp<sup>R</sup> F' lac<sup>q</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>lacY<sup>+</sup> pro<sup>+</sup> attB::[glmS-5'-lacZ (glmS -311 to +129) aadA (spec<sup>R</sup>)]</i>	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z9	$\Delta$ ( <i>pho-bgl</i> )201 $\Delta$ ( <i>lac-pro</i> ) <i>ara thi</i> , <i>strp<sup>R</sup> F' lac<sup>q</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>lacY<sup>+</sup> pro<sup>+</sup> attB::[glmU-5'-glmU-glmS-5'-lacZ (glmU -392 to glmS +129) aadA (spec<sup>R</sup>)]</i>	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z10	W3110 $\Delta$ <i>lacU169 gal 490 <math>\lambda</math>cl857</i> $\Delta$ ( <i>cro-bioA</i> ) $\Delta$ <i>yhbK::cat</i>	Diese Arbeit
Z11	W3110 $\Delta$ <i>lacU169 gal 490 <math>\lambda</math>cl857</i> $\Delta$ ( <i>cro-bioA</i> ) $\Delta$ <i>yhbJ::cat</i>	Diese Arbeit
Z12	$\Delta$ ( <i>pho-bgl</i> )201 $\Delta$ ( <i>lac-pro</i> ) <i>ara thi</i> $\Delta$ <i>nagC::tc</i>	Laborsammlung B. Görke, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen
Z24	R1279 <i>yhbJ::cat</i>	Diese Arbeit und (Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z27	Z8 <i>yhbJ::cat</i>	Diese Arbeit und (Kalamorz <i>et al.</i> 2007)

## Anhang

Z28	Z8 $\Delta yhbJ$	Diese Arbeit und (Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z29	Z2 $ybhK::cat$	Diese Arbeit
Z30	Z2 $\Delta ybhK$	Diese Arbeit
Z31	Z3 $ybhK::cat$	Diese Arbeit
Z32	Z3 $\Delta ybhK$	Diese Arbeit
Z37	R1279 $\Delta yhbJ$	Diese Arbeit und (Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z38	Z8 $glmZ::cat$	Diese Arbeit und (Reichenbach <i>et al.</i> 2008)
Z39	Z8 $\Delta glmZ$	Diese Arbeit
Z40	Z9 $\Delta glmZ::cat$	Diese Arbeit und (Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z41	Z9 $\Delta glmZ$	Diese Arbeit
Z42	Z5 $glmZ::cat$	Diese Arbeit und (Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z43	Z5 $\Delta glmZ$	Diese Arbeit und (Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z44	R1279 $glmZ::cat$	Diese Arbeit und (Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z45	R1279 $\Delta glmZ$	Diese Arbeit und (Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z46	R2413 $glmZ::cat$	Diese Arbeit und (Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z47	R2413 $\Delta glmZ$	Diese Arbeit und (Reichenbach <i>et al.</i> 2008)
Z52	N3431 $\Delta yhbJ::cat$	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z53	N3433 $\Delta yhbJ::cat$	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z60	R1279 $hfq1::omega$	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z61	Z24 $hfq1::omega$	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z62	R1279 $hfq2::omega$	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z63	Z24 $hfq2::omega$	(Kalamorz <i>et al.</i> 2007)
Z79	R1279 $\Delta ptsN$	Diese Arbeit
Z87	R1279 $dgoT::cat$	Diese Arbeit
Z88	R1279 $\Delta dgoT$	Diese Arbeit
Z89	R2413 $dgoT::cat$	Diese Arbeit
Z90	R2413 $\Delta dgoT$	Diese Arbeit
Z91	R1279 $yjiR::cat$	Diese Arbeit
Z92	R1279 $\Delta yjiR$	Diese Arbeit
Z93	R2413 $yjiR::cat$	Diese Arbeit
Z94	R2413 $\Delta yjiR$	Diese Arbeit
Z95	R1279 $glmY::cat$	Diese Arbeit und (Reichenbach <i>et al.</i> 2008)
Z96	R1279 $\Delta glmY$	Diese Arbeit und (Reichenbach <i>et al.</i> 2008)
Z97	R2413 $glmY::cat$	Diese Arbeit
Z98	R2413 $\Delta glmY$	Diese Arbeit
Z184	R1279 $\Delta rpoN$	Laborsammlung B. Görke, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen

## 7.2. Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz / Quelle
pBAD18	Expressionsplasmid; P <sub>ara</sub> -promoter, MCS 2, bla/cat/amp, pBR322-ori	(Guzman et al. 1995)
pBAD30	Expressionsplasmid; P <sub>ara</sub> -promoter, MCS 2, bla, pACYC-ori	(Guzman et al. 1995)
pBAD33	Expressionsplasmid; P <sub>ara</sub> -promoter, MCS 2, cat, pACYC-ori	(Guzman et al. 1995)
pBGG15	transkriptionelle Fusion von <i>E. coli glmU</i> -5' (-392 to +240) an lacZ in pKES-15	(Kalamorz et al. 2007)
pBGG16	transkriptionelle Fusion von <i>E. coli glmS</i> -5' ( <i>glmS</i> -311 to +129) an lacZ in pKES-15	(Kalamorz et al. 2007)
pBGG17	transkriptionelle Fusion von <i>E. coli glmU</i> -5'- <i>glmU</i> - <i>glmS</i> -5' ( <i>glmU</i> -392 to <i>glmS</i> +129) an lacZ in pKES-15	(Kalamorz et al. 2007)
pBGG56	<i>E. coli glmS</i> unter tacOP-Kontrolle. Konstruktion: Ligation mit 3 Fragmenten: 1. pFDX3543 ΔXbaI/SacII (2392 bp), 2. pFDX3543 ΔSacII/BamHI (767 bp), 3. <i>glmS</i> + 15 bp stromaufwärts aus PCR mit BG180/BG181, ΔBamHI/XbaI.	Diese Arbeit und (Kalamorz et al. 2007)
pBGG57	pBGG56, jedoch <i>glmS</i> ersetzt durch <i>glmZ</i> Konstruktion: pBGG56 ΔXhoI/XbaI (3168 bp) ligiert mit Produkt aus PCR mit BG186/BG187 ΔXhoI/XbaI.	Diese Arbeit
pBGG58	transkriptionelle Fusion von <i>E. coli glmZ</i> + intergenische Region ( <i>glmZ</i> -424 to <i>glmZ</i> +172) an lacZ in pKES-15 Konstruktion: pKES15 ΔSacI/XbaI ligiert mit Produkt aus PCR mit BG199/BG201 ΔSacI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG59	transkriptionelle Fusion von <i>E. coli glmZ</i> + intergenische Region ( <i>glmZ</i> -424 bis <i>glmZ</i> +31) ) an lacZ in pKES-15 Konstruktion: pKES15 ΔSacI/XbaI ligiert mit Produkt aus PCR mit BG199/BG202 ΔSacI/XbaI	Diese Arbeit und (Kalamorz et al. 2007)
pBGG63	<i>yhbJ</i> -Gly8Ala-Mutante mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des P <sub>ara</sub> -Promoters in pBAD33	Laborsammlung B. Görke
pBGG83	<i>glmZ</i> mit den intergenischen Bereichen stromauf- und abwärts ( <i>glmZ</i> -416 bis <i>glmZ</i> +254 ) unter Kontrolle des P <sub>ara</sub> -Promoters in pBAD30 Konstruktion: pBAD30 ΔSacI/XbaI ligiert mit Produkt aus PCR mit BG234/BG 237 ΔSacI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG84	<i>glmZ</i> mit 100 bp stromaufwärts und intergenischen Bereich stromabwärts ( <i>glmZ</i> -100 bis <i>glmZ</i> +) unter Kontrolle des P <sub>ara</sub> -Promoters in pBAD30 Konstruktion: pBAD30 ΔSacI/XbaI ligiert mit Produkt aus PCR mit BG235/BG 237 ΔSacI/XbaI	(Kalamorz et al. 2007)
pBGG85	<i>glmZ</i> mit intergenischen Bereich stromabwärts ( <i>glmZ</i> +1 bis <i>glmZ</i> +) unter Kontrolle des P <sub>ara</sub> -Promoters in pBAD30 Konstruktion: pBAD30 ΔSacI/XbaI ligiert mit Produkt aus PCR mit BG236/BG 237 ΔSacI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG88	<i>glmM</i> unter Kontrolle des P <sub>ara</sub> -Promoters in pBAD18 ( <i>amp</i> ). Konstruktion: pBAD18 ΔSacI/XbaI ligiert mit Produkt aus PCR mit BG280/BG 281 ΔSacI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG89	<i>glmZ</i> + intergenische Region stromaufwärts ( <i>glmZ</i> -424 bis <i>glmZ</i> +172 ) unter Kontrolle des P <sub>ara</sub> -Promoters in pBAD18 ( <i>amp</i> ). Konstruktion: pBAD18 ΔSacI/XbaI ligiert mit Produkt aus PCR mit BG234/ BG275 ΔSacI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG90	<i>glmZ</i> + intergenische Region stromabwärts ( <i>glmZ</i> -100 bis <i>glmZ</i> +172) unter Kontrolle des P <sub>ara</sub> -Promoters in pBAD18 ( <i>amp</i> ). Konstruktion: pBAD18 ΔSacI/XbaI ligiert mit Produkt aus PCR mit BG235/BG 275 ΔSacI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG91	<i>glmZ</i> ( <i>glmZ</i> +1 bis <i>glmZ</i> +172) unter Kontrolle des P <sub>ara</sub> -Promoters in pBAD18 ( <i>amp</i> ). Konstruktion: pBAD18 ΔSacI/XbaI ligiert mit Produkt aus PCR mit BG236/BG 275 ΔSacI/XbaI	Diese Arbeit

## Anhang

pBGG95	<i>glmM</i> unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD18 ( <i>cat</i> ). Konstruktion: pBAD18 $\Delta$ SacI/XbaI ligiert <i>glmM</i> -Fragment aus pBGG88 $\Delta$ SacI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG105	<i>yhbJ</i> mit N-terminalen Strep-Tag Konstruktion: pGP172 $\Delta$ KpnI/EcoRI ligiert mit Fragment aus PCR mit BG306/BG307 $\Delta$ KpnI/EcoRI	Diese Arbeit
pBGG106	<i>ybhK</i> mit N-terminalen Strep-Tag Konstruktion: pGP172 $\Delta$ KpnI/EcoRI ligiert mit Fragment aus PCR mit BG313/BG314 $\Delta$ KpnI/EcoRI	Diese Arbeit
pBGG109	<i>yhbJ</i> - $\Delta$ AA 256- mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD33 Konstruktion: pBAD33 $\Delta$ SacI/XbaI ligiert mit Fragment aus PCR mit BG209/BG 310 $\Delta$ SacI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG110	<i>yhbJ</i> -Gly8Ala mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD33 Konstruktion: pBAD33 $\Delta$ SacI/XbaI ligiert mit Fragment aus PCR mit BG210/BG 310 $\Delta$ SacI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG119	<i>yhbJ</i> mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD33 Konstruktion: Ligation mit 3 Fragmenten: 1. pBAD33 $\Delta$ SacI/XbaI, 2. Fragment aus PCR mit BG209/BG324 $\Delta$ SacI/NcoI, 3. Fragment aus PCR mit BG346/BG212 $\Delta$ NcoI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG120	<i>yhbJ</i> G13A mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD33 Konstruktion: Ligation mit 3 Fragmenten: 1. pBAD33 $\Delta$ SacI/XbaI, 2. Fragment aus PCR mit BG323/BG324 $\Delta$ SacI/NcoI, 3. Fragment aus PCR mit BG346/BG212 $\Delta$ NcoI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG121	<i>yhbJ</i> $\Delta$ AA164 – 212 mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD33 Konstruktion: Ligation mit 3 Fragmenten: 1. pBAD33 $\Delta$ SacI/XbaI, 2. Fragment aus PCR mit BG323/BG324 $\Delta$ SacI/NcoI, 3. Fragment aus PCR mit BG325/BG212 $\Delta$ NcoI/XbaI.	Diese Arbeit
pBGG122	<i>yhbJ</i> F167A mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD33 Konstruktion: Ligation mit 3 Fragmenten: 1. pBAD33 $\Delta$ SacI/XbaI, 2. Fragment aus PCR mit BG209/BG324 $\Delta$ SacI/NcoI, 3. Fragment aus PCR mit BG326/BG212 $\Delta$ NcoI/XbaI.	Diese Arbeit
pBGG123	<i>yhbJ</i> G168L mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD33 Konstruktion: Konstruktion: Ligation mit 3 Fragmenten: 1. pBAD33 $\Delta$ SacI/XbaI, 2. Fragment aus PCR mit BG209/BG324 $\Delta$ SacI/NcoI, 3. Fragment aus PCR mit BG327/BG212 $\Delta$ NcoI/XbaI	Diese Arbeit
pBGG124	<i>yhbJ</i> mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD33 Konstruktion: Ligation mit 3 Fragmenten: 1. pBAD33 $\Delta$ SacI/XbaI, 2. Fragment aus PCR mit BG209/BG330 $\Delta$ SacI/BamHI, 3. Fragment aus PCR mit BG328/BG212 $\Delta$ BamHI/XbaI.	Diese Arbeit
pBGG125	<i>yhbJ</i> N188A mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD33 Konstruktion: Ligation mit 3 Fragmenten: 1. pBAD33 $\Delta$ SacI/XbaI, 2. Fragment aus PCR mit BG209/BG331 $\Delta$ SacI/BamHI, 3. Fragment aus PCR mit BG328/BG212 $\Delta$ BamHI/XbaI..	Diese Arbeit
pBGG126	<i>yhbJ</i> P189A mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD33	Diese Arbeit

## Anhang

	Konstruktion: Ligation mit 3 Fragmenten: 1. pBAD33 $\Delta$ SacI/XbaI, 2. Fragment aus PCR mit BG209/BG332 $\Delta$ SacI/BamHI, 3. Fragment aus PCR mit BG328/BG212 $\Delta$ BamHI/XbaI..	
pBGG127	<i>yhbJ</i> G199L mit authentischer Shine-Dalgarno-Sequenz unter Kontrolle des $P_{ara}$ -Promoters in pBAD33 Konstruktion: Ligation mit 3 Fragmenten: 1. pBAD33 $\Delta$ SacI/XbaI, 2. Fragment aus PCR mit BG209/BG330 $\Delta$ SacI/BamHI, 3. Fragment aus PCR mit BG329/BG212 $\Delta$ BamHI/XbaI.	Diese Arbeit
pBGG149	<i>glmY</i> unter $P_L$ -Kontrolle in pFDX1088	(Reichenbach et al. 2008)
pBGG161	<i>yhbJ</i> mit C-terminalen His(10)-Tag unter $P_{tac}$ -Kontrolle in pKES170 Konstruktion: pKES170 $\Delta$ NdeI-XbaI ligiert mit Fragment aus PCR mit BG394/BG395 $\Delta$ NdeI-XbaI	Diese Arbeit
pBGG162	<i>yhbJ</i> mit N-terminalen His(10)-Tag unter $P_{tac}$ -Kontrolle in pKES170 Konstruktion: pKES170 $\Delta$ NdeI-PstI ligiert mit Fragment aus PCR mit BG396/BG397 $\Delta$ NdeI-PstI	Diese Arbeit
pBGG165	translationale <i>lptA</i> (-152) $\rightarrow$ <i>rpoN</i> (+79)- <i>lacZ</i> -Fusion in pKEM20 Konstruktion: pKEM20 $\Delta$ SaII-XbaI ligiert mit Fragment aus PCR mit BG400/BG401 $\Delta$ SaII-XbaI	Diese Arbeit
pBGG166	translationale <i>lptB</i> (+100) $\rightarrow$ <i>rpoN</i> (+79)- <i>lacZ</i> -Fusion in pKEM20 Konstruktion: pKEM20 $\Delta$ SaII-XbaI ligiert mit Fragment aus PCR mit BG402/BG401 $\Delta$ SaII-XbaI	Diese Arbeit
pBGG168	translationale <i>lptB</i> (+100) $\rightarrow$ <i>yhbJ</i> (+168)- <i>lacZ</i> -Fusion in pKEM20 Konstruktion: pKEM20 $\Delta$ SaII-XbaI ligiert mit Fragment aus PCR mit aus PCR mit BG402/BG404 $\Delta$ SaII-XbaI	Diese Arbeit
pCP20	<i>bla</i> , <i>cat</i> ; FLP Rekombinase unter Kontrolle eines temperatursensitiven Promotors; ori pSC101 <sup>repTS</sup>	(Datsenko und Wanner 2000)
pFDX3453	<i>bglG</i> unter $P_{tac}$ -Kontrolle, MCS hinter <i>bglG</i> , <i>tet</i> , pACYC-ori	(Görke and Rak 1999).
pFDX4291	pSC101-ori, <i>cat</i> , Operatorloses $P_{tac}$ , BglIII, <i>sacB</i> -RBS, NdeI, XbaI, HincII	(Kalamorz et al. 2007)
pFDX4292	<i>ptsO</i> unter $P_{tac}$ -Kontrolle in pFDX4291	(Kalamorz et al. 2007)
pFDX4294	<i>ptsN</i> unter $P_{tac}$ -Kontrolle in pFDX4291	(Kalamorz et al. 2007)
pFDX4296	<i>ptsN</i> , <i>yhbJ</i> , <i>ptsO</i> unter $P_{tac}$ -Kontrolle in pFDX4291	(Kalamorz et al. 2007)
pFDX4320	<i>yhbJ</i> , <i>ptsO</i> unter $P_{tac}$ -Kontrolle in pFDX4291	(Kalamorz et al. 2007)
pFDX4322	<i>ptsO</i> and <i>ptsN</i> unter $P_{tac}$ -Kontrolle in pFDX4291	(Kalamorz et al. 2007)
pFDX4324	<i>yhbJ</i> unter $P_{tac}$ -control in pFDX4291	(Kalamorz et al. 2007)
pKD3	<i>cat</i> -Kassette mit stromabwärts gelegener Ribosomensbindestelle zur Vermeidung polarer Effekte, siehe 3.5.3.	(Datsenko und Wanner 2000).
pKD46	Helferplasmid mit $\lambda$ -Rekombinasesystem unter $P_{ara}$ -Kontrolle, <i>bla</i> ; ori pSC101 <sup>repTS</sup> , siehe 3.5.3.	(Datsenko und Wanner 2000)
pKEM4	ori p15A, <i>neo</i> , <i>attP</i> , <i>aadA</i> , <i>T4gene32</i> -Terminator, promoterloses <i>lacZ</i>	Laborsammlung K. Schnetz, Institut für Genetik, Köln
pKEM20	ori p15A, <i>neo</i> , <i>attP</i> , <i>aadA</i> , <i>T4gene32</i> -Terminator, $P_{proV}$ - <i>lacZ</i> . Vektor für translationale <i>lacZ</i> Fusionen.	Laborsammlung K. Schnetz, Institut für Genetik, Köln
pKES15	ori p15A, <i>neo</i> , <i>attP</i> , <i>aadA</i> , <i>T4gene32</i> -Terminator, $P_{proV}$ - <i>lacZ</i> . Vektor für transkriptionale <i>lacZ</i> Fusionen.	Laborsammlung K. Schnetz, Institut für Genetik, Köln
pKES170	<i>bla</i> , <i>lacI</i> , $P_{tac}$ , SD T7 Gen 10, NdeI, XbaI, pBR322-ori. Vektor für Protein-Überproduktion	Laborsammlung K. Schnetz, Institut für Genetik, Köln
pKESK18	Tn10-Transposase unter $\lambda P_R$ -control, $\lambda$ cI <sub>857</sub> , mTn10:: <i>cat</i> , pSC101- <sup>rep</sup> <sub>TS</sub> , <i>neo</i>	(Madhusudan et al. 2005)

## 7.3. Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
BG25	GTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	Sequenzierung <i>lacZ</i> -Fusionen
BG80	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATC	Degenerierter Primer für 1. Schritt der ST-PCR
BG81	GCTCTAGAGGCCACGCGTCGACTAGTAC	2. Schritt der ST-PCR. identisch zum definierten Bereich von BG80
BG82	TTTGCATGCTTCAAAGCCTGTCGGAATTGG	1. Schritt der ST-PCR, paart im <i>mTn10</i> -Transposon, rechtes Ende
BG83	GCTCTAGAATTCACGGTTTACCCAC TTATAAACAAAAGATCGG	2. Schritt der ST-PCR, paart im <i>mTn10</i> -Transposon, rechtes Ende
BG84	AAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCC	1. Schritt der ST-PCR, paart im <i>mTn10</i> -Transposon, linkes Ende
BG85	GCTCTAGACGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGGG	2. Schritt der ST-PCR, paart im <i>mTn10</i> -Transposon, linkes Ende
BG96	TGATGCAGGAAATGGGTCTG	fwd-check <i>yhbK</i>
BG97	GGCGGAGCTGCAATACGC	rev-check <i>yhbK</i>
BG146	AAGTAATCGCAACATCCGCATTA	Sequenzierung von Insertionen in pKES15
BG155	CAATTTGCGCTACTGTAGCGCGGATAATCTGACTCCAGG AAACTATG <b>GTG</b> AGGCTGGAGCTG <b>CTTCG</b>	fwd-Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>yhbK</i>
BG156	CACTTTGTCTTCAATAGGAAGCCGGAATTTTCCTTCGGAT TTCCGTTAA <b>CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCC</b>	rev-Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>yhbK</i>
BG157	GTTATTCGGTAATGTCTCTTTTAGACGTTGTGAGGAGAAA CAGTAC <b>GTG</b> AGGCTGGAGCTG <b>CTTCG</b>	fwd-Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>yhbJ</i>
BG158	GGCATGCATGCCAGCTTGTTTGTGATTCAACAGTTTGC TTGACGGT <b>CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCC</b>	rev-Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>yhbJ</i>
BG159	GTTTGTAGGCCGGATAAGGC	fwd-check- <i>yhbK</i>
BG160	CGTGCATCGTCTTTAGAGG	rev-check <i>yhbK</i>
BG161	GGATACCGAAGGTACTCCGG	fwd-check- <i>yhbJ</i>
BG162	CGTAAGAGCACTTCAGCGTC	rev-check <i>yhbJ</i>
BG163	CGTGGTATTCACTCCAGAGCG	fwd-check <i>cat</i> (pKD3)
BG164	GCTGGTGATATGGGATAGTG	rev-check <i>cat</i> (pKD3)
BG180	GCGGGATC <b>CTCG</b> AGAAATCGGAATCAAAA <b>ACTATGTGT</b> GG	fwd- <i>glmS</i> BamHI/XhoI

## Anhang

BG181	CGGTCTAGATTACTCAACCGTAACCGATTTTGCC	rev- <i>glmS</i> <i>Xba</i> I
BG182	CGGGCATACAGGTTGACCGACAACGATATAAATCGGAAT CAAAAAC <b>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</b>	fwd-Primer zur Generierung der Kassette zur markerlosen Deletion von <i>glmS</i>
BG183	CAGGAAGAAAAATGCCCGCTTACGCAGGGCATCCATTT ATTAC <b>CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCC</b>	rev-Primer zur Generierung der Kassette zur markerlosen Deletion von <i>glmS</i>
BG184	GGGATGTTATTTCCCGATTCTCTGTGGCATAATAAACGAG <b>TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</b>	fwd-Primer zur Generierung der Kassette zur markerlosen Deletion von <i>glmZ</i>
BG185	CACCCGGAGGCAAGCACCTCCGGGGCCTTCCTGATACAT <b>CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCC</b>	rev-Primer zur Generierung der Kassette zur markerlosen Deletion von <i>glmZ</i>
BG186	GCGCTCGAGGTAGATGCTCATTCCATCTCTTAT TTCGCC	fwd- <i>glmZ</i> <i>Xho</i> I
BG187	GCGTCTAGAGCACCTCCGGGGCCTTCCTGATACAT	rev- <i>glmZ</i> - <i>Xba</i> I
BG188	GTGTAGGATCAAGCTCAGG	fwd-check <i>glmZ</i>
BG189	CAGCTATGCGTCGCGACG	rev-check <i>glmZ</i>
BG190	GCGGGATCCGCAAAATGCTCCGGTTTCATGTCATC	fwd- <i>glmZ</i> - <i>Bam</i> HI
BG191	GCGCTCGAGTTCCTTCTCACCCGGAGGCAAGCA	rev- <i>glmZ</i> - <i>Xho</i> I
BG197	CTTACAAGACGAACACGTTAAGC	fwd-check <i>rpoN</i>
BG198	GTCTTCCTTATCGGTTGGGTC	rev-check <i>rpoN</i>
BG199	GCACGCGTCGACGCAAAATGCTCCGGTTTCATG	fwd- <i>glmZ</i> (-421) <i>Sa</i> II
BG200	GCACGCGTCGACGATGCTGTTTTTAGTTTTAACGGC	fwd- <i>glmZ</i> (-207) <i>Sa</i> II
BG201	GCGTCTAGAAAAACAGGTCTGTATGACAACAAGTGGG	rev- <i>glmZ</i> (+172) <i>Xba</i> I
BG202	GCGTCTAGAGGGCGAACATAAGAGATGGAATGAGC	rev- <i>glmZ</i> (+30) <i>Xba</i> I
BG203	GCATGAGAGGAAATCAGGCGCTTCGCCGCTATTTCGAAT <b>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</b>	fwd-Primer zur Generierung der Kassette zur markerlosen Deletion von <i>yjiR</i>
BG204	CCGGTTTTTCTCTCTGTATGGTCCACATAAGGAATACAGC <b>CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCC</b>	rev-Primer zur Generierung der Kassette zur markerlosen Deletion von <i>yjiR</i>
BG205	CCTGGTCAGGCGTTCACATGGCATCC	fwd-check <i>yjiR</i>
BG206	CCTCATCTTTTCAGAGGCTTCATCATCCACC	rev-check <i>yjiR</i>
BG229	AGATTAGCGGATCCTACCTG	Sequenzierung pBAD18/30/33 (fwd)
BG232	TGATTTAATCTGTATCAGGCTG	Sequenzierung pBAD18/30/33 (rev)
BG233	CGGACGCCTACGATTACGC	rev-check- <i>glmZ</i>
BG234	GGCGAGCTCGCAAAATGCTCCGGTTTCATGTC	fwd- <i>glmZ</i> Position -424 <i>Sac</i> I
BG235	GGCGAGCTCTCAGGAAGTTATTACTCAGGAAGC	fwd- <i>glmZ</i> Position -100 <i>Sac</i> I
BG236	GGCGAGCTCGTAGATGCTCATTCCATCTCTTATGTTTCG	fwd- <i>glmZ</i> <i>Sac</i> I
BG237	GGCTCTAGATTCTTCTCACCCGGAGGCAAGCACC	rev- <i>glmZ</i> Position +254 <i>Xba</i> I
BG244	GCGCAGTGGTGTGGCACATATTCCACAGTTGAAGGAGTG <b>TAGGCTGGAGCTGCTTCG</b>	fwd-Primer zur Generierung der Kassette zur

## Anhang

		markerlosen Deletion von <i>agoT</i>
BG245	CGGCTTCGCTATGCCCAAAATCTGGAGAAAGCTCGCTCA TATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCC	rev-Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>agoT</i>
BG246	GCCTTTCTGATTGGTGAAGCGG	fwd-check- <i>agoT</i>
BG247	CGTAAGCCCCTCATCGGGC	rev-check- <i>agoT</i>
BG248	CAACAAAGCCGGGAATTACCCGGCTTTGTTATGGAA GTG TAGGCTGGAGCTGCTTCG	fwd-Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>glmY</i>
BG249	CTATTTCTTTATTGGCACAGTTACTGCATAATAGTAACC CATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCC	rev-Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>glmY</i>
BG250	GGTGTTACTCTCGTCAGACGCG	fwd-check- <i>glmY</i>
BG251	GTCTCTTTTTAGCGACACAGTGGC	rev-check- <i>glmY</i>
BG254	AAAGTCAGCGAAGGAAATG	rev- <i>sraC</i> r/c für in vitro Transkription
BG255	CTAATACGACTCACTATAGGGAGATCACCAGAACGGGCG G	fwd- <i>sraC</i> r/c mit T7-Promotor für in vitro Transkription
BG275	GGCTCTAGAAAAACAGGTCTGTATGACAACAAGTGG	rev- <i>glmZ</i> prozessiert <i>XbaI</i>
BG276	GCGACAATCGCCGCTTTTTAGCCAGTTATCTAACGCTGT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG	fwd-Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>glmM</i>
BG277	GGAAGCCACTCTGTCTGCAAAGGAAAACAAACGCTCATA TGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCC	rev-Primer zur Generierung der Kasette zur markerlosen Deletion von <i>glmM</i>
BG278	GCTTCAACCAATAAAGCGGG	fwd-check- <i>glmM</i>
BG279	GCGGTAGTCTGGCCTGTGCG	rev-check- <i>glmM</i>
BG280	GGCGAGCTCATGAGTAATCGTAAATATTTCCG	fwd- <i>glmM</i> <i>SacI</i>
BG281	GGCTCTAGATTAAACGGCTTTTACTGCATCGGCG	rev- <i>glmM</i> <i>XbaI</i>
BG306	TCCGAATTCTATGGTACTGATGATCGTCAGCGGACG	fwd- <i>yhbJ</i> <i>EcoRI</i>
BG307	AGGGGTACCTGGTTTACGTTTTTCCAGCGTACGATGGCG	rev- <i>yhbJ</i> <i>KpnI</i>
BG310	GGCTCTAGAGGTACCATACACCGAACGGTGCTTCCCGCC GG	rev- <i>yhbJ</i> Position 765 <i>KpnI</i>
BG323	TCCCCGGGAGCTCGTGAGGAGAAACAGTACATGGTACT GATGATCGTCAGCGGACGTTCCAGGCTCAGG	fwd- <i>yhbJ</i> G13A <i>SacI</i>
BG324	CAAAGACCATGGTCAGTTCGCGTTTAC	rev- <i>yhbJ</i> Position 493 <i>NcoI</i>
BG325	AACTGACCATGGTCACAGAAGTACACAATTTTATCTACC	fwd- <i>yhbJ</i> Position 636 <i>NcoI</i>
BG326	GAAGTACCATGGTCTTTGAGTCTGCCGGCTTCAAACAC GGT	fwd- <i>yhbJ</i> Position 475 F167A <i>NcoI</i>
BG327	GAAGTACCATGGTCTTTGAGTCTTTCCTTTCAAACACG GT	fwd- <i>yhbJ</i> Position 475 G168L <i>NcoI</i>
BG328	CGCACTGGGATCCGAAACTGCGTCCAATGACAGGT	fwd- <i>yhbJ</i> Position 566 <i>BamHI</i>
BG329	CGCACTGGGATCCGAAACTGCGTCCAATGACACTTC TTGA	fwd- <i>yhbJ</i> Position 566 G199L <i>BamHI</i>



Anhang

BG330	CAGTTTCGGATCCCAGTGC GGGTTCGGCAAGAAG	rev- <i>yhbJ</i> Position 585 <i>Bam</i> HI
BG331	CAGTTTCGGATCCCAGTGC GGGGCCGGCAAGAAG	rev- <i>yhbJ</i> Position 585 P189A <i>Bam</i> HI
BG332	CAGTTTCGGATCCCAGTGC GCGTTCGGCAAGAAG	rev- <i>yhbJ</i> Position 585 N188A <i>Bam</i> HI
BG346	GAAC TGACCATGGTCTTTGAGTCTTTCCGGCTTCAAACAC GGT	fwd- <i>yhbJ</i> Position 475 <i>Nco</i> I
BG349	GAGCCCGAAGTGGCGAG	Sequenzierung pKES170 (fwd)
BG350	GACCCGTTTAGAGGCC	Sequenzierung pKES170 (rev)
BG351	CGTCATATGGTACTGATGATCGTCAGC	fwd- <i>yhbJ</i> <i>Nde</i> I
BG352	ATCCTCGAGTCATGGTTTACGTTTTCCAG	rev- <i>yhbJ</i> <i>Xho</i> I
BG353	CCACCATACCCACGCCG	Sequenzierung pET16B (fwd)
BG354	CCCTGGATGCTGTAGGC	Sequenzierung pET16B (rev)
BG367	GCACGCGTCGACGATCCAACGGTTTGATCCG	fwd- <i>rpoN</i> Position 542 <i>Sal</i> I für <i>lacZ</i> -Fusionen
BG368	GCGTCTAGAGATCCCAGTGC GGGTTCGGC	rev- <i>yhbJ</i> Position 576 <i>Xba</i> I für <i>lacZ</i> -Fusionen
BG369	TCCGAGCTCTATGGTACTGATGATCGTCAGCG	fwd- <i>yhbJ</i> <i>Sac</i> I
BG370	TCCGAGCTCTATGCGCAATCGTACGCTGGC	fwd- <i>yhbK</i> <i>Sac</i> I
BG371	AGGGGTACCTTATGGTTTACGTTTTCCAGCGTACG	rev- <i>yhbJ</i> <i>Kpn</i> I
BG394	CTCGTACTCATATGGTACTGATGATCGTCAGC	fwd- <i>yhbJ</i> <i>Nde</i> I
BG395	CGCTCTAGATGGTTTACGTTTTCCAGCG	rev- <i>yhbJ</i> <i>Xba</i> I
BG396	CTCGTACTCATATGCATCATCATCATCATCATCATCAT CATGCTAGCATGGTACTGATGATCGTCAG	fwd-His(10)- <i>yhbJ</i> <i>Nde</i> I
BG397	TGGCTGCAGTCTAGATTATCATGGTTTACGTTTTCCAGC G	rev- <i>yhbJ</i> <i>Pst</i> I
BG400	GCCCTCGAGGGTCCGTAAAAGCAGATAAAGCC	fwd- <i>lptB</i> für <i>lacZ</i> - Fusionen <i>Xho</i> I
BG401	GCCTCTAGACAACAGACGAATTGCCT	rev- <i>rpoN</i> für <i>lacZ</i> - Fusion <i>Xba</i> I
BG402	GCCTCGAGTGCTGGGGCCAAACGG	fwd- <i>lptA</i> für <i>lacZ</i> - Fusion <i>Xho</i> I
BG404	GCCTCTAGAAAAACCCATATCTTCCAGCGC	rev- <i>yhbJ</i> für <i>lacZ</i> - Fusion <i>Xba</i> I
BG407	ATGAAGCAAGGTTTGCAACTCAGGC <b>GTGTAGGCTGGAGC TGCTTCG</b>	fwd-Primer zur Generierung der Kassette zur markerlosen Deletion von <i>rpoN</i>
BG408	AACGAGTTGTTTACGCTGGTTTGACGG <b>CATATGAATATCC TCCTTAGTTCCTATTC</b>	rev-Primer zur Generierung der Kassette zur markerlosen Deletion von <i>rpoN</i>
BG409	CGCGTTGGCCGATTCATTAATGC	Sequenzierung pKES170 (fwd)
BG410	Ccatcggcgctacggcgttc	Sequenzierung pKES170 (rev)
BG425	CGAGTCACCAGAAATATTCGAAC	fwd- <i>yhbJ</i> (Sondenherstellung für Northern Blot Analyse)
BG426	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTTGTTGGTTTCCA</u> GCATAGG	rev- <i>yhbJ</i> mit T7- Promotor (Sondenherstellung für Northern Blot Analyse)

Anhang

BG427	CAAAGACCATGGTCAGTTCGCGTTCACGTTTAC	rev- <i>yhbJ</i> Position 493 <i>NcoI</i>
BG428	GAAGTACCATGGTCTTTGAGTCTTTCCTCTTCAAACACG GTATCC	fwd- <i>yhbJ</i> Position 475 G168L <i>NcoI</i>
BG429	CCTGGTGAAAAGAGCAGAAAATGC	fwd-check <i>lptB</i>
BG430	GCCAGTTGTTGGCTAAGCC	rev-check <i>lptB</i>
BG431	GAACAAGGTATCATGGTGGC	fwd-check <i>hpf</i>
BG432	CCACTCAAACAGTGGAACAG	rev-check <i>hpf</i>
BG444	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> GTAGATGCTCATTCCATCTCTTATG	fwd- <i>glmZ</i> mit T7- Promotor (in vitro Transkription)
BG445	AAAAAAACGCCTGCTCTTATTACGGAGC	rev- <i>glmZ</i> unprozessiert für in vitro Transkription
BG446	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> AAGTGGCTCATTC ACCGACTTATGTC	fwd- <i>glmY</i> mit T7- Promotor (in vitro Transkription)
BG447	AACAAAGCCGGGAATTACCCGGC	rev- <i>glmY</i> unprozessiert für in vitro Transkription
BG448	AAGGCGGTGCCTAACTCGACG	rev- <i>glmY</i> prozessiert für in vitro Transkription
BG449	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> AATTGTGAGCGG ATAACAATTCAC	fwd- <i>lacZ</i> mit T7- Promotor (in vitro Transkription)
BG450	CGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTG	rev- <i>lacZ</i> (in vitro Transkription)
BG458	GCCAAACGGTGCCGGTAAGA	fwd- <i>lptB</i> (Sondenherstellung für Northern Blot Analyse)
BG459	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAT</u> CAAATGCC CCTGACTGAC	rev- <i>lptB</i> mit T7- Promotor (Sonden- herstellung für Northern Blot Analyse)
BG460	AGGATTACCTGATGTGGCAGG	fwd- <i>rpoN</i> (Sonden- herstellung für Northern Blot Analyse)
BG461	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> ACCGTCCAGTG ACCGTTATGC	rev- <i>rpoN</i> mit T7- Promotor (Sonden- herstellung für Northern Blot Analyse)
BG471	CAACAAGTGGGTGCTTCACTC	rev- <i>glmZ</i> prozessiert für in vitro Transkription
BG472	CCGAGGGGAAGTTCAGATAC	rev- <i>glmZ</i> unprozessiert für in vitro Transkription
BG473	ATCATGCTAGCATGGTACTGATGATCGTCAGC	fwd- <i>yhbJ</i> <i>NheI</i>
BG474	GGCTCTAGATTATCATGGTTTACGTTTTTCCAGCGT ACGATGGCGTGACTGGACGTTTGCACCGCGCGAG	rev- <i>yhbJ</i> K270A <i>XbaI</i>
BG475	GGCTCTAGATTATCATGGTTTACGTTTTTCCAGCGT ACGAGCGCGTGACTGG	rev- <i>yhbJ</i> H276A <i>XbaI</i>
BG476	GCTTAGCAGTGTTCTTAACAGG	fwd- <i>ptsN</i> (Sondenherstellung für Northern Blot Analyse)
BG477	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGTAATGATTT</u> GATACAGCTC	rev- <i>ptsN</i> mit T7- Promotor (Sondenherstellung für Northern Blot Analyse)

## Anhang

BG527	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGTCAGCGAA</u> GGAAATG	fwd- <i>sraC</i> mit T7- Promotor (in vitro Transkription)
BG528	ATCACCAGAACGGGCGG	rev- <i>sraC</i> (in vitro Transkription)
BG529	<u>CTAATACGACTCACTATAGGGAGGCAAAGGGGAGT</u> AACTTC	fwd- <i>sraF</i> mit T7- Promotor (in vitro Transkription)
BG530	AAAAAACGGCCAACGTCG	rev- <i>sraF</i> (in vitro Transkription)

Schnittstellen der genannten Enzyme sind fett gedruckt, Sdequenzen komplementär zur pKD3-Rsistenzkassette in rot. T7-Promotorsequenzen sind unterstrichen. Alle Sequenzen sind 5'-3' geschrieben.

### 7.4. Zusätzlich verwendete Materialien

#### 7.4.1. Chemikalien

Neben den an den an den entsprechenden Stellen genannten Substanzen wurden folgende weitere Chemikalien benutzt:

Acrylamid	Fa. Roth, Karlsruhe
Agar	Fa. Roth, Karlsruhe
Agarose	Fa. Peqlab, Erlangen
Antibiotika	Fa. Sigma, München
Blocking-Reagenz	Fa. Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Fa. Serva, Heidelberg
CDP*	Fa. Roche, Mannheim
dNTPs	Fa. Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Fa. Merck, Darmstadt
Imidazol	Fa. Serva, Heidelberg
IPTG	Fa. Peqlab, Erlangen
Magermilchpulver	Fa. BD, Sparks, USA
Ni <sup>2+</sup> -Agarose Superflow	Fa. Quiagen, Hilden
ONPG	Fa. Sigma, München
TEMED	Fa. Merck, Darmstadt
Tween 20	Fa. Sigma, München

Alle sonstigen allgemeinen Chemikalien wurden von Merck, Serva, Fluka, Sigma oder Roth in p.a. Qualität bezogen.

7.4.2. Antikörper, Enzyme und Oligonukleotide

Zusätzlich zu den bereits genannten wurden folgende Enzyme verwendet:

Lysozym aus Hühnereiweiß	Fa. Merck, Darmstadt
Polyklonaler Antikörper gegen <i>E. coli</i> GlmS	erhalten von Bernard Badet
Polyklonaler Antikörper gegen <i>E. coli</i> YhbJ	Fa. SeqLab, Göttingen
Oligonukleotide	Fa. Operon, Köln
Restriktionsendonukleasen	Fa. Fermentas, St. Leon-Rot

7.4.3. Hilfsmittel

Folgende Hilfsmittel fanden Verwendung :

Dialyseschläuche	Fa. Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Fa. Terumo Medical Corporation, Somerset, USA
Gene Amp Reaction Tubes (PCR)	Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt
Glaspipetten	Fa. B.Brand, Wertheim
Halbmikroküvetten aus Kunststoff	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Kunststoffpetrischalen	Fa. Greiner, Nürtingen
Küvetten aus Kunststoff	Fa. Greiner, Nürtingen
Mikroliterpipetten (2µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Fa. Gilson, Düsseldorf Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Fa. Greiner, Nürtingen Fa. Eppendorf, Hamburg Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Polyethylenröhrchen	Fa. Greiner, Nürtingen
Poly-Prep Chromatography Columns	Fa. Bio-Rad, München
Polyvinylidendifluorid (PVDF)- Membran	Fa. Bio-Rad, München
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Fa. Greiner, Nürtingen
Zentrifugenbecher	Fa. Beckmann, München

7.4.4. Geräte

Für diese Arbeit wurden folgende allgemeine Geräte genutzt:

Biofuge 15	Fa. Heraeus Christ, Osterode
Biofuge fresco	Fa. Heraeus Christ, Osterode
Biofuge primo R	Fa. Heraeus Christ, Osterode
Blotting-Apparatur VacuGene XI	Fa. Amersham, Freiburg
Dampfsterilisator LTA32/25	Fa. Zirbus, Bad Grund
Feinwaage Sartorius CP64	Fa. Sartorius, Göttingen
French Press	Spectonic Unicam, England
Horizontalschüttler 3006	GFL, Burgwedel
Kulturschüttler Innova 2300	Fa. New Brunswick, Neu-Isenburg
Kulturschüttler Lab-Shaker Modell „Kühne“	Fa. B. Braun, Melsungen
Kulturschüttler RO 106	Fa. Infors, Basel, Schweiz
Magnetrührer REO basic C	Fa. JAK Werk, Staufen
pH-Meter 766 Calimatic	Fa. Knick, Berlin
PowerPack Basic	Fa. Bio-Rad, München
Sterilbank HeraSafe	Fa. Heraeus Christ, Osterode
Sorvall RC5B plus	Fa. Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Spektralphotometer UltraSpec 2000	Fa. Amersham, Freiburg
TE70 Semiphor Semi-Dry Transfer Unit	Fa. Amersham, Freiburg
Thermoblock 1.0	Fa. Waasetec, Göttingen
Ultrazentrifuge Sorvall Ultra pro 80	Fa. Beckman, München
Waage Sartorius CP22025	Fa. Sartorius, Göttingen
Wasserbad Typ 3047	Fa. Küttermann Labortechnik, Uetze- Hänigsen
Wasservollentsalzungsanlage	Fa. Millipore, Schwalbach

7.4.5. Computerprogramme

Zusätzlich zu den bisher genannten Computerprogramme wurde zum Erstellen dieser Arbeit das Office XP-Paket (Fa. Microsoft, Redmond, USA) sowie für die Literaturrecherche und -verwaltung EndNote X.2 (Fa. Thomson ISI ResearchSoft, Philadelphia, USA)

**7.5. Rohdaten der  $\beta$ -Galaktosidase-Messungen**

Mittelwerte und Abweichungen beruhen auf mindestens 3 unabhängigen Messungen

Abb. 4.3.

Stamm	Mittelwert	Abweichung
Wildtyp	4,7	1,3
$\Delta[ptsN-npr]$	139,2	14,7
$\Delta yhbJ$	105,6	9,1
-88	4,61	0,8
-59	4,5	0,7
-1	14,5	3,5
6	4,5	0,7
10	6,33	1,5
12	3,5	0,7
16	4,5	0,7
30	8,5	2,1
74	5	0
83	7	1,4
84	5,3	0,57

Abb. 4.5.:

	Mittelwert	Abweichung
Wildtyp	11,15	1,06
Wildtyp + pBAD30	7,95	2,76
Wildtyp + pBAD30:: <i>glmZ</i>	20,35	3,46
$\Delta glmZ \Delta[ptsN-npr]$	8,6	0,14
$\Delta glmZ \Delta[ptsN-npr]$ + pBAD30	6,7	0,14
$\Delta glmZ \Delta[ptsN-npr]$ + pBAD30:: <i>glmZ</i>	76,65	4,24

Abb. 4.6.:

	Mittelwert		
	Leervektor	<i>glmZ'</i> -lacZ	$P_{lacUV}$ -lacZ
WT	300,02	7426,65	21055,35
$\Delta yhbJ$	145,75	8658,05	21117,35
$\Delta glmZ$	107	8217	21374,5
	Abweichung		
	Leervektor	<i>glmZ'</i> -lacZ	$P_{lacUV}$ -lacZ
WT	1,767	577,21	300,72
$\Delta yhbJ$	12,09	854,25	1167,92
$\Delta glmZ$	11,73	375,76	1149,04

Abb. 4.9.A

Stamm			+ <i>glmZ</i> auf Plasmid		+1% GlcNAc	
	Mittelwert	Abweichung	Mittelwert	Abweichung	Mittelwert	Abweichung
Wildtyp	8	3,5	9	0,7	4	0,7
$\Delta$ [ <i>ptsN-npr</i> ]	154	1,4	146	13,4	123	12,7
<i>glmS</i> (-7)::m <i>Tn10</i>	30	0	6	0,7	6	0
<i>glmS</i> (+5)::m <i>Tn10</i>	60	10,6	10	1,4	7	1,4
<i>glmS</i> (-63)::m <i>Tn10</i>	62	5,7	13	2,8	20	4,9

Abb. 4.10.

t [h]	Mittelwert			
	$\Delta$ <i>glmS</i>	$\Delta$ <i>glmS</i> + 1% GlcNAc	Wildtyp	Wildtyp + 1% GlcNAc
0	92,9	71	105,5	125,3
1	116,7	52,4	108,6	131,4
2	225,4	46	60	73
3	379,7	104,5	58,3	68,7
4	640,1	90,9	74,5	69,1
5	800,8	85,2	62,6	56
6	852,1	78,2	66,3	60,3

t [h]	Abweichung			
	$\Delta$ <i>glmS</i>	$\Delta$ <i>glmS</i> + 1% GlcNAc	Wildtyp	Wildtyp + 1% GlcNAc
0	2	4,1	4,8	3,7
1	53,3	3,4	3,9	3
2	25,2	2,2	2,5	4,1
3	58,7	1,6	2	3,4
4	98,7	4,6	2,1	2,7
5	68,8	6,2	5,6	3,3
6	944	3,3	4,9	4,3

t [h]	OD <sub>600</sub>			
	$\Delta$ <i>glmS</i>	$\Delta$ <i>glmS</i> + 1% GlcNAc	Wildtyp	Wildtyp + 1% GlcNAc
0	0,39	0,41	0,50	0,45
1	0,99	1,11	1,58	1,41
2	2,9	3,57	3,27	2,63
3	3,26	4,77	5,78	5,22
4	1,67	6,68	7,07	7,64
5	0,73	7,79	7,25	7,43
6	0,73	8,08	7,08	7,16

Abb.4.12.

Fosfomycin

Zeit [h]	Konzentration [mg/ml]							
	0	1	2	5	10	25	50	100
0	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
1	0,74	0,75	0,71	0,55	0,28	0,09	0,10	0,09
2	1,8z	2,10	1,69	1,31	0,08	0,07	0,07	0,06
3	2,28	2,54	1,69	0,15	0,06	0,08	0,06	0,05
4	2,92	3,56	2,54	0,07	0,06	0,08	0,05	0,04
5	3,72	3,53	2,85	0,07	0,05	0,07	0,05	0,04
6	3,88	4,25	3,11	0,07	0,05	0,07	0,05	0,04
7	4,12	4,48	3,76	0,08	0,06	0,04	0,04	0,04
8	4,24	4,32	3,87	0,09	0,06	0,05	0,04	0,04

Ampicillin

Zeit [h]	Konzentration [mg/ml]							
	0	1	2	5	10	25	50	100
0	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
1	0,75	0,68	0,76	0,71	0,487	0,40	0,11	0,10
2	1,72	1,91	1,58	1,37	0,28	0,08	0,07	0,07
3	2,59	2,07	1,89	1,20	0,13	0,06	0,06	0,05
4	2,88	2,11	2,09	1,32	0,09	0,06	0,05	0,05
5	4,56	1,93	2,74	1,28	0,09	0,06	0,05	0,04
6	4,13	2,90	3,01	1,27	0,09	0,06	0,05	0,04
7	4,68	2,79	3,08	1,26	0,10	0,06	0,05	0,04
8	4,42	3,22	3,16	1,34	0,11	0,07	0,05	0,04

N-Ethylmaleimid

Zeit [h]	Konzentration [mg/ml]							
	0	DMSO	0,1	1	5	10	50	100
0	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
1	0,73	0,63	0,73	0,71	0,38	0,32	0,29	0,28
2	2,31	1,81	2,04	2,11	0,58	0,34	0,27	0,26
3	2,70	3,12	3,46	2,77	0,96	0,48	0,25	0,25
4	3,16	2,86	3,27	3,08	2,82	0,73	0,24	0,25
5	5,46	3,64	4,51	3,75	3,00	1,27	0,24	0,24
6	4,62	3,74	4,62	4,34	4,09	3,24	0,23	0,23
7	5,25	3,99	5,49	4,60	4,32	4,24	0,22	0,23
8	4,82	4,13	5,44	4,80	4,39	3,59	0,21	0,21

Nva-FMDP

Zeit [h]	Konzentration [µg/ml]							
	0	1	5	10	20	50	100	300
0	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
1	0,78	0,78	0,77	0,78	0,77	0,78	0,77	0,71
2	2,22	2,70	2,45	2,23	2,20	2,16	1,95	1,90
3	2,33	2,20	2,70	2,78	2,89	2,82	2,75	2,55
4	3,24	3,45	3,39	3,38	3,29	3,42	3,33	2,99
5	4,61	3,23	4,25	4,22	4,16	4,23	4,01	3,95
6	4,65	3,88	4,24	4,31	5,17	4,56	4,79	4,50
7	4,45	3,58	4,45	4,40	4,58	4,66	4,67	4,28
8	4,77	4,31	4,80	4,752	4,87	5,35	4,63	4,52



Abb. 4.13.

Messwert		Konzentration [mg/ml]						
Zeit [h]	w/o	DMSO	EtOH	Amp 2	Amp 50	Fos 2	Fos 50	
0	216,3							
1	370,6	399,6	407,7	409,3	385,7	422,9	340,9	
3	236,8	172,5	158,4	192,7	335,4	185,3	352,9	
5	172,5	159,4	142,5	131,8	426,1	147,8	529,3	

Messwert		Konzentration [mg/ml]			
Zeit [h]	NVA-FMDP 3,3	NVA-FMDP 100	NEM 10	NEM 50	
1	584,2	1210	139,4	165,5	
3	359,9	2220,5	72	111,1	
5	175	1389,6	240,5	160,2	

OD <sub>600</sub>		Konzentration [mg/ml]						
Zeit [h]	w/o	DMSO	EtOH	Amp 2	Amp 50	Fos 2	Fos 50	
0	0,28	0,289	0,289	0,28	0,28	0,28	0,28	
1	0,74	0,69	0,751	0,75	0,07	0,22	0,07	
3	2,00	2,12	2,57	2,32	0,04	0,57	0,06	
5	3,06	3,29	3,43	4,38	0,03	1,34	0,05	

OD <sub>600</sub>		Konzentration [mg/ml]			
Zeit [h]	NVA-FMDP 3,3	NVA-FMDP 100	NEM 10	NEM 50	
1	0,28	0,28	0,28	0,28	
3	0,76	0,70	0,32	0,28	
5	2,70	2,07	0,45	0,24	
	4,06	3,49	1,27	0,22	

Abb.4.14.

Messwert		Konzentration [µg/ml]							
Zeit [h]	0	1	5	10	20	50	100	300	
0	251,4								
1	300,7	312	354,1	401,1	511,1	740,1	1077,5	1538	
2	203	136,4	182,3	227,4	392,4	683,7	1180,8	1516,5	
3	270	306,4	257,7	335,6	396	669,9	943,8	1841,4	
4	221,5	185,4	198,6	242	304,7	547,8	779,1	1694	

## Anhang

Zeit [h]	Konzentration [µg/ml]							
	0	1	5	10	20	50	100	300
0	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
1	0,78	0,78	0,77	0,78	0,77	0,78	0,77	0,71
2	2,25	2,70	2,45	2,23	2,20	2,16	1,95	1,90
3	2,33	2,20	2,70	2,78	2,89	2,82	2,75	2,55
4	3,24	3,45	3,39	3,38	3,29	3,42	3,33	2,99
5	4,61	3,23	4,25	4,22	4,16	4,23	4,01	3,95
6	4,65	3,88	4,24	4,31	5,17	4,56	4,79	4,50
7	4,45	3,58	4,45	4,40	4,58	4,66	4,67	4,28
8	4,77	4,31	4,80	4,75	4,87	5,35	4,63	4,52

Abb. 4.15.

	t [h]	0	1	3	5
Stamm					
Wildtyp		216,3	370,6	236,8	172,5
Wildtyp + FMDP 100			1210	2220,5	1389,6
Wildtyp + FMDP100 + 1% GlcNAc			183	161,9	130,5

Abb 4.17.

Messwert	t[h]	0	1	3	5
Stamm					
$\Delta glmZ$		263,7	343,5	221,5	179,8
$\Delta glmZ$ + Nva-FMDP 100			386,7	241	216
$\Delta glmZ$ + Nva-FMDP 100 + 1% GlcNAc			165	122,9	124,7
$\Delta glmZ$ + NEM 10			108,3	361,8	213,7

OD <sub>600</sub>	t[h]	0	1	2	3	4	5
Stamm							
$\Delta glmZ$		0,522	1	2,87	4,59	5,41	6,1
$\Delta glmZ$ + Nva-FMDP 100		0,522	1	1,56	2,04	2,34	2,63
$\Delta glmZ$ + Nva-FMDP100 + 1% GlcNAc		0,522	1	4,22	6,26	6,5	6,78

Abb. 4.24.

Stamm	Mittelwert		Abweichung		
	ohne Arabinose	mit Arabinose	ohne Arabinose	mit Arabinose	
Wildtyp		7,54	8,01	1,27	1,41
$\Delta yhbJ$		71,45	69,11	5,39	3,95
$\Delta yhbJ$ pBAD 33		67,10	67,28	4,52	1,20
$\Delta yhbJ$ pBAD 33:: <i>yhbJ</i> WT		29,00	7,88	4,61	3,31
$\Delta yhbJ$ pBAD 33:: <i>yhbJ</i> G8A		55,25	23,33	0,63	2,25
$\Delta yhbJ$ pBAD 33:: <i>yhbJ</i> G13A		30,05	9,18	2,33	3,21
$\Delta yhbJ$ pBAD 33:: <i>yhbJ</i> F167A		74,81	74,04	0,42	1,17
$\Delta yhbJ$ pBAD 33:: <i>yhbJ</i> G168L		72,73	74,87	4,66	1,65
$\Delta yhbJ$ pBAD 33:: <i>yhbJ</i> N188A		64,65	65,25	1,34	2,04
$\Delta yhbJ$ pBAD 33:: <i>yhbJ</i> P189A		62,75	65,51	4,31	7,78
$\Delta yhbJ$ pBAD 33:: <i>yhbJ</i> G199L		61,64	66,56	6,92	7,88
$\Delta yhbJ$ pBAD 33:: <i>yhbJ</i> $\Delta$ AA164 – 212		73,12	76,07	8,90	7,28
$\Delta yhbJ$ pBAD 33:: <i>yhbJ</i> $\Delta$ AA256 – 284		70,96	70,17	4,36	1,61
$\Delta yhbJ$ pBAD 33:: <i>yhbJ</i> G8A $\Delta$ AA256 – 284		71,32	74,21	1,73	2,66

Abb. 4.25.

	Mittelwert		Abweichung	
	ohne IPTG	mit IPG	ohne IPTG	mit IPTG
Wildtyp	4,65	5,27	1,33	1,08
<i>ΔyhbJ</i>	105,62	108,97	8,31	0
<i>ΔyhbJ pKES170</i>	97,65	88,50	4,10	7,35
<i>ΔyhbJ pKES170::yhbJ-His(10)</i>	3,55	3,65	1,62	1,90
<i>ΔyhbJ pKES170::His(10)-yhbJ</i>	3,25	3,35	0,63	0,63

Abb. 4.30.

Stamm	Mittelwert	Abweichung
Wildtyp + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ	1805	192
Wildtyp + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ	1538	54
Wildtyp + [ <i>rpoN-yhbJ</i> ]-lacZ	607	87
<i>ΔyhbJ</i> + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ	2079	48
<i>ΔyhbJ</i> + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ	1858	89
<i>ΔyhbJ</i> + [ <i>rpoN-yhbJ</i> ]-lacZ	840	128
<i>ΔptsN</i> + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ	1580	652
<i>ΔptsN</i> + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ	1866	90
<i>ΔptsN</i> + [ <i>rpoN-yhbJ</i> ]-lacZ	749	77
<i>ΔrpoN</i> + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ	1359	62
<i>ΔrpoN</i> + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ	1367	117
<i>ΔrpoN</i> + [ <i>rpoN-yhbJ</i> ]-lacZ	645	7

Abb. 4.31.

Stamm	Messwert	Abweichung
Wildtyp + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ	1805	192
Wildtyp + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ	1538	54
Wildtyp + [ <i>rpoN-yhbJ</i> ]-lacZ	607	87
<i>ΔyhbJ</i> + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ	2079	48
<i>ΔyhbJ</i> + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ	1858	89
<i>ΔyhbJ</i> + [ <i>rpoN-yhbJ</i> ]-lacZ	840	128
Wildtyp + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ + pBAD33::yhbJ	427	54
Wildtyp + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ + pBAD33::yhbJ	427	76
Wildtyp + [ <i>rpoN-yhbJ</i> ]-lacZ + pBAD33::yhbJ	121	18
Wildtyp + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ + pBAD33::yhbJ + Arabinose	342	37
Wildtyp + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ + pBAD33::yhbJ + Arabinose	306	49
Wildtyp + [ <i>rpoN-yhbJ</i> ]-lacZ + pBAD33::yhbJ + Arabinose	109	12

Abb.4.32.

Stamm	Mittelwert	Abweicung
Wildtyp + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ	1805	192
Wildtyp + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ	1538	54
Wildtyp + [ <i>lptB-yhbJ</i> ]-lacZ	607	87
<i>ΔnagC::tc</i> + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ	978	236
<i>ΔnagC::tc</i> + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ	931	130
<i>ΔnagC::tc</i> + [ <i>lptB-yhbJ</i> ]-lacZ	915	101

Abb. 4.33

Stamm	Mittelwert	Abweichung
Wildtyp + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ	1291	52
Wildtyp + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ	1370	40
Wildtyp + [ <i>lptB-yhbJ</i> ]-lacZ	578	15
Wildtyp + [ <i>lptA-rpoN</i> ]-lacZ + 1% GlcNAc	1574	16
Wildtyp + [ <i>lptB-rpoN</i> ]-lacZ + 1% GlcNAc	1331	1
Wildtyp + [ <i>lptB-yhbJ</i> ]-lacZ + 1% GlcNAc	613	8

## 7.6. Rohdaten zur Charakterisierung von YhbJ (siehe 4.3)

### 7.6.1. Verwendete Proteinsequenzen

AciSP. = <i>Acinetobacter</i> sp.	ActPle = <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
ActSuc = <i>Actinobacillus succinogenes</i>	AerHyd = <i>Aeromonas hydrophila</i>
AerSal = <i>Aeromonas salmonicida</i>	AlkMet = <i>Alkaliphilus metalliredigenes</i>
AltBac = <i>Alteromonadales bacterium</i>	AlteMac = <i>Alteromonas macleodii</i>
AzoSp. = <i>Azoarcus</i> Sp.	BacAnt = <i>Bacillus anthracis</i>
BacCer = <i>Bacillus cereus</i>	BacCla = <i>Bacillus clausii</i>
BacCoa = <i>Bacillus coagulans</i>	BacHal = <i>Bacillus halodurans</i>
BacLic = <i>Bacillus licheniformis</i>	BacSub = <i>Bacillus subtilis</i>
BacThu = <i>Bacillus thuringiensis</i>	BacWei = <i>Bacillus weihenstephanensis</i>
BifLon = <i>Bifidobacterium longum</i>	CalSac = <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>
CarHyd = <i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i>	CloAce = <i>Clostridium acetobutylicum</i>
CloBei = <i>Clostridium beijerincki</i>	CloPer = <i>Clostridium perfringens</i>
CloTet = <i>Clostridium tetani</i>	CloThe = <i>Clostridium thermocellum</i>
ColPsy = <i>Colwellia psychrerythraea</i>	CorEff = <i>Corynebacterium effescens</i>
DesbHaf = <i>Desulfotobacterium hafniense</i>	DesRed = <i>Desulfotomaculum reducens</i>
EntSp. = <i>Enterobacter</i> sp.	EntcFae = <i>Enterococcus faecalis</i>
EntcFae = <i>Enterococcus faecium</i>	ErwCar = <i>Erwinia carotovora</i>
EscCol = <i>Escherichia coli</i>	ExiSib = <i>Exiguobacterium sibiricum</i>
FusNuc = <i>Fusobacterium nucleatum</i>	GeoKau = <i>Geobacillus kaustophilus</i>
GeoThe = <i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	GloVio = <i>Gloeobacter violaceus</i>
HaeDuc = <i>Haemophilus ducreyi</i>	HaeInf = <i>Haemophilus influenzae</i>
HaeSom = <i>Haemophilus somnus</i>	HalOre = <i>Halothermothrix orenii</i>
IdiBal = <i>Idiomarina baltica</i>	IdiLoi = <i>Idiomarina loihiensis</i>
KlePne = <i>Klebsiella pneumoniae</i>	LacAci = <i>Lactobacillus acidophilus</i>
LacCas = <i>Lactobacillus casei</i>	LacDel = <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
LacGas = <i>Lactobacillus gasserii</i>	LacJoh = <i>Lactobacillus johnsonii</i>
LacPla = <i>Lactobacillus plantarum</i>	LacReu = <i>Lactobacillus reuteri</i>
LacSak = <i>Lactobacillus sakei</i>	LacSal = <i>Lactobacillus salivarius</i>
LactLac = <i>Lactococcus lactis</i>	LeiXyl = <i>Leifsonia xylis</i>
LisInn = <i>Listeria innocua</i>	LisMon = <i>Listeria monocytogenes</i>
LisWel = <i>Listeria welshimeri</i>	ManSuc = <i>Mannheimia succiniciproducens</i>
MarAqu = <i>Marinobacter aquaeolei</i>	MooThe = <i>Moorella thermoacetica</i>
MycSme = <i>Mycobacterium smegmatis</i>	MycTub = <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NitEur = <i>Nitrosomas europea</i>	NocFar = <i>Nocardia farcinica</i>
Ocelhe = <i>Oceanobacillus iheyensis</i>	PasMul = <i>Pasteurella multocida</i>
PedPen = <i>Pediococcus pentosaceus</i>	PhoPro = <i>Photobacterium profundum</i>
PhorLum = <i>Photorhabdus luminescens</i>	ProMir = <i>Proteus mirabilis</i>
PseAtl = <i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	PseHal = <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
PseTun = <i>Pseudoalteromonas tunicata</i>	SalEnt = <i>Salmonella enterica</i> serovar
SalTyp = <i>Salmonella typhimurium</i>	SerPro = <i>Serratia proteamaculans</i>
SheBal = <i>Shewanella baltica</i>	SheDef = <i>Shewanella denitrificans</i>
SheFri = <i>Shewanella frigidimarina</i>	SheLoi = <i>Shewanella loihica</i>
SheOne = <i>Shewanella oneidensis</i>	ShePut = <i>Shewanella putrefaciens</i>
SheWoo = <i>Shewanella woodyi</i>	ShiFle = <i>Shigella flexneri</i>
SodGlo = <i>Sodalis glossinidius</i>	StaAur = <i>Staphylococcus aureus</i>
StaEpi = <i>Staphylococcus epidermidis</i>	StaHae = <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
StaSap = <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	StrAlg = <i>Streptococcus agalactiae</i>
StrMut = <i>Streptococcus mutans</i>	StrPne = <i>Streptococcus pneumoniae</i>
StrPyo = <i>Streptococcus pyogenes</i>	StrSan = <i>Streptococcus sanguinis</i>
StrSui = <i>Streptococcus suis</i>	StrThe = <i>Streptococcus thermophilus</i>
StpAve = <i>Streptomyces avermitilis</i>	SymThe = <i>Symbiobacterium thermophilum</i>
TheThe = <i>Thermus thermophilus</i>	TherEth = <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
TherTen = <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	ThesCar = <i>Thermosinus carboxydivorans</i>
VibAlg = <i>Vibrio alginolyticus</i>	VibAng = <i>Vibrio angustum</i>
VibCho = <i>Vibrio cholerae</i>	VibFis = <i>Vibrio fischeri</i>
VibHar = <i>Vibrio harveyi</i>	VibPar = <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
VibSpl = <i>Vibrio splendidus</i>	VibVul = <i>Vibrio vulnificus</i>
YerBer = <i>Yersinia bercovieri</i>	YerEnt = <i>Yersinia enterocolitica</i>

# Anhang

YerFre = *Yersinia frederksenii*  
YerPes = *Yersinia pestis*  
ZymMob = *Zymomonas mobilis*

YerMol = *Yersinia mollaretii*  
YerPse = *Yersinia pseudotuberculosis*

>ACISP\_AC1AD3059  
MKRILVITGGSSGKSSALQVLEDLGYCIDNPLPALLPEIVAKLDHENNLEQLALGVDRSTRADMQEFDLVFEQLQKHGTVDVVIYTTQDQELIARFASRRPHPL  
ASRFKSLNECIEQEKQLLPIQFRSTVHIIDTTDKSVHDLKHTLLSKLGGSDKLILQLSFGYKHGIPLDADYVDFVRHLPNPHWDELRRFSGLDEPVRFLFSSDQNT  
EMFDDHFHLDKWLPLVFAEGHRHYMTVSIQCTGGQHRSVYIVDRLLKKALEAKWSIQVLHREMKHWS

>ACTPLE\_ZP\_00133926  
MELIISGRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPPLPELAGFLSNRGRSAVSLDIRNIPENPESIEALLEQLSKLTIQTKIIFLDCERNTLIRRYSDTRRLHPLSNKDL  
LESAIDLENTLEPLYQQANYIIDTTNISSELAENLRGLRSTDKALKIVFESFGFYGLPADADYVDFVRHLPNPHWDELRRFSGLDEPVRFLFSSDQNT  
TRNYLEMWLPMLKNNRSYLTIAIGCTGGKHSVFAEQLAKYFQSRDKDQVQIRHRSLEKHHK

>ACTSUC\_ZP\_00733020  
MELIISGRSGGKSVLRALEDVGYCVDNLPIDLLPQLADLISQSSQASAIISLDIRNLPNSOHLDEILTELENKHQIKIIFLDADRSTLIRRYSDSRRLHPLSVQNDL  
SLEAAIDAEQIQLDPLIQHANLIIDTAVLSTHELAERLREFLRGNSDKELKIVFESFGFYGLPADADYVDFVRHLPNPHWDELRRFSGLDEPVRFLFSSDQNT  
TTRNYIETWLPMLERNRSYLTIAIGCTGGKHSVYIAQQLGEYFQDKGKHVKIHKHLEKHHK

>AERHYD\_AHA\_3920  
MQLIVVSGRSGGKTVLALRVLEDLGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDKLAVSIDVRNLPASPDKLETLAQRVNEGRVEFSSFFDAENSTLLKRYGESRRLHPL  
SLEAAIDAEQIQLDPLIQHANLIIDTAVLSTHELAERLREFLRGNSDKELKIVFESFGFYGLPADADYVDFVRHLPNPHWDELRRFSGLDEPVRFLFSSDQNT  
MQFILQIENMLATWLPHLERNRSYVTVIGCTGGQHRSVFAEQLAGAFRLLGKNVQIRHRTLDKSAQF

>AERSAL\_ABO88502  
MQLIVVSGRSGGKTVLALRVLEDLGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDKLAVSIDVRNLPVADKLETLAQRVNEGRVEFSSFFDAENSTLLKRYGESRRLHPL  
SLEAAIDAEQIQLDPLIQHANLIIDTAVLSTHELAERLREFLRGNSDKELKIVFESFGFYGLPADADYVDFVRHLPNPHWDELRRFSGLDEPVRFLFSSDQNT  
MQFILQIENMLATWLPHLERNRSYVTVIGCTGGQHRSVFAEQLAGAFRLLGKNVQIRHRTLDKSTPQ

>ALKMET\_UPF0042  
MKFVIITGLSGAGKSTVKSMEFDGFCYVDNLPALIPKFAELCHOSQGVISRAALVIDIRGMMFDDLFESLKELEHLGHQYEIFLADDEVLMKRFKETRSHPL  
NVDGSIENGITRERELLQELKDRASHIHTKLIQAQLKEELRNIVVEGNMNNLMSIASFGFKHGIPLDSDLVDFVRHLPNPFYIEELKDFTGNDVKVRNYVMNSPIS  
VEFSNKLHDVIFLPIPHYVQEGKNQLVISIGCTGGHRSVTIAHVLYHQLKDKGHRVTLSHR DSGETRERKK ES

>ALTBAC\_ATW7\_18740  
MELIISGRSGGKSVLRALEDVGYCVDNIPVLLPQLIVSVESQYDKLAVSIDVRNLPKPEQDEFNHIEYLPGFTKPTLFYLDSESDQTLKRFSETR RLHPLSIDS  
PLDLAIKKEKELLDVLTIRADYDITSELSVHLAESIREKILGKDKQLVTFESFGFKHGIPKEADYVDFARFLPNPHWDELRRFSGLDEPVRFLFSSDQNT  
SHSIVQKFTW QIQTFVQWLPHLERNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYLAQTIQGESFVTHPNVKIRHREQE K

>ALTEMAC\_MADE\_14619  
MKLIISGRSGGKSVLRALEDVGYCVDNIPVLLPQLIVSVESQYDKLAVSIDVRNLPKPNPDDLVEILDYLPSSWSMTIVYDASDDVVKRFSETRRLHPLAKLNK  
SLSEAIRAESALLAPIAERADLYLDTDKLTIHQALAEIRILGKSSRLVLFESFGFKHGIPKADYVDFARFLPNPHWDELRRFSGLDEPVRFLFSSDQNT  
QIQNLITWLPHLERNRSYVTVIGCTGGQHRSVYIAQTLKTFSEIHPDVQIRHREL N Q

>AZOSP\_EBA3650  
MQIVLISGLSGGKSVLRALEDVGYCVDNIPVLLPQLIVSVESQYDKLAVSIDVRNLPKPNPDDLVEILDYLPSSWSMTIVYDASDDVVKRFSETRRLHPLAKLNK  
DVSIAEAIQSERDALASIAELGHRIDTSELHANTRAWIKDLAIEATEGLTLMFQSFQFKYGIPLDADLVDFVRHLPNPHWDELRRFSGLDEPVRFLFSSDQNT  
CEDIRRFVATWLPYARDNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYIAEWLGRHFSDDLRLVLRHRSARRIVDHGADMA DK

>BACANT\_GBAA5384  
MTENNNDIKMVIITGMSGAGKTVLQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFIELMADSKGKMNKVALGVDLGRGREFFEHLWGALDDLERTWIIPHILFLDAKDSLTVTRYKE  
TRRSHPLAPTGLPLKIEIERSLTDMKARANIVLDTSDLKPKELREKIVHLFSTETEQAQFRVNVMSFGFKYGIPIADLVDFVRHLPNPHYIPHMKPLTGLDEEVSSYV  
LKFNETHKLEKLTDLITFMLPHYKREGKSQLVIAIGCTGGQHRSVTLTEYLGKHLKPEYSVHVSHRDVEKRRKG

>BACCRER\_UPF0042  
MTENNNDIKMVIITGMSGAGKTVLQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFVELMADSKGKMNKVALGIDLGRGREFFEHLWGALDDLERTWIIPHILFLDAKDSLTVTRYKE  
RTHPLAKGGLPLEGIQKERNLEEIKGRAQQIIDTELKPLQREKIMQRFAGNDRQAFVHFVFSFGFKYGIPIADLVDFVRHLPNPHYIPHMKPLTGLDEEVSSYV  
VLKFNETHKLEKLTDLITFMLPHYKREGKSQLVIAIGCTGGQHRSVTLAEYLGKHLKPDYSVHVSHRDVEKRRKG

>BACCLA\_ABC3036  
MNQSEVEIIVITGMSGAGKTVLQSFEDLGYCIDNLPVLLPKFIELIEGIDKVTKVALVMDLRGQSFDELFAIDELNETPASRLKIQLYLDKDSLQVRYKETR  
RTHPLAKGGLPLEGIQKERNLEEIKGRAQQIIDTELKPLQREKIMQRFAGNDRQAFVHFVFSFGFKYGIPIADLVDFVRHLPNPHYIPHMKPLTGLDEEVSSYV  
KWKETKQFVEKLTDLDFMLPHYKREGKSQLVIAIGCTGGQHRSVTLAEYFCAHYEAKYDAYTSHRDINKRANSR

>BACCOA\_UPF0042  
MGLEGNQMQFVITGMSGAGKTVLQSFEDLGYFCVDNLPPTLPLKPFLELMKADSNKMNKVALVMDLRGREFFDDLFRALDELKSSWVPTTILFLDADDSVLRVRY  
KETRSHPLAPTGLPLEGIQKERNLEEIKGRAQQIIDTELKPLQREKIMQRFAGNDRQAFVHFVFSFGFKYGIPIADLVDFVRHLPNPHYIPHMKPLTGLDEEVSSYV  
TYVWKWNETQKLEKLTDLDFMLPHYKREGKSQLVIAIGCTGGQHRSVTLAEYIGHFFEKDYHTTISHRDIKRRKEERK

>BACHAL\_BH3569  
MNVKEEIDIVITGMSGAGKTVLQSFEDLGYCVDNLPALIPKFIELIESSGKMNKVALVIDLRGQTFDDQLFESIDLQDSSSKYNIQILFLDAKDAKLVQRYKET  
RRSHPLAKHGLPLDGIKKERELLEDLKGRAQQIIDTELKPIQLREKIIQRFSCHEHHSFTVNMMSFGFKYGIPIADLVDFVRHLPNPHYIPHMKPLTGLDEEVSSYV  
LKWTEITQQFIEKLEDLFSLMPLQYKREGKSQLVIAIGCTGGQHRSVTLAEHFAKVFANEYMMHVSHRDVEKRRKG

>BACLIC\_YVCJ  
MNLANGHDQLVITGMSGAGKTVLQSFEDLGYFCVDNLPVLLPKFLELMKESSSKMSKVALVMDLRGREFFDRLIEALDEIGETSWITPRILFLDAKDSLTVTRYK  
ETRSHPLATTGLPLEGIQTERELLEELKGRSQIYDTSMDKPKDLREKIVQHFADHGHTFTVNMMSFGFKYGLPIADLVDFVRHLPNPHYIPHMKPLTGLDEEVSSYV  
SYVMKWNETQKLEKLTDLITFMLPHYKREGKSQLVIAIGCTGGQHRSVTLAEYLADYFKDYTHVTHRDIE KKSRRK

>BACSUB\_YVCJ  
MSVSESHDQLVITGMSGAGKTVLQSFEDLGYCVDNLPVLLPKFLELMKESNSKMSKVALVMDLRGREFFDRLIEALDEIEMENPWITPRILFLDAKDSLTVTRYK  
ETRSHPLAATGLPLEGIALERELLEELKGRSQIYDTSMDKPKDLREKIVQHFADHGHTFTVNMMSFGFKYGIPIADLVDFVRHLPNPHYIPHMKPLTGLDEEVSSYV  
YVMKWNETQKFNELKIDLLSFMPLSYKREGKSQLVIAIGCTGGQHRSVTLAEYLADYFKDYTHVTHRDIEKRSR

>BACTHU\_ZP\_00739740  
MTENNNDIKMVIITGMSGAGKTVLQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFIELMADSKGKMNKVALGIDLGRGREFFEHLWGALDDLERTWIIPHILFLDAKDSLTVTRYKE  
TRRSHPLAPTGLPLKIEIERSLTDMKARANIVLDTSDLKPKELREKIVHLFSTETEQAQFRVNVMSFGFKYGIPIADLVDFVRHLPNPHYIPHMKPLTGLDEEVSSYV  
VLKFNETHKLEKLTDLITFMLPHYKREGKSQLVIAIGCTGGQHRSVTLTEYLGKHLKPEYSVHVSHRDVEKRRKG

>BACWEI\_UPF0042  
MTENNNDIKMVIITGMSGAGKTVLQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFIELMADSKGKMNKVALGIDLGRGREFFEHLWGALDDLERTWIIPHILFLDAKDSLTVTRYKE  
TRRSHPLAPTGLPLKIEIERSLTDMKARANIVLDTSDLKPKELREKIVHLFSTETEQAQFRVNVMSFGFKYGIPIADLVDFVRHLPNPHYIPHMKPLTGLDEEVSSYV  
VLKFNETHKLEKLTDLITFMLPHYKREGKSQLVIAIGCTGGQHRSVTLTEYLGKHLKPEYSVHVSHRDVEKRRKG

>BIFLON\_BL0705  
MNQQTNRDTEGAAATNAPANASATSTSPDNQPTPLDAFEVLLITGMSGAGRSHAADCVEDMGWYVVDNLPKLLIPLVDMTTSGSGSESGVHKLAAVIDVRSS  
YFDELAALVGLHDDLGVKTRILFLDASNEVLIKRYESVRRPHPLQHGKRLIDGILEERHLEDLKERADWIDTSSLHQLSTKLYEAMLGSGGTTTVAHVHIFSGFKY  
GMPIDADVADVRFLPNPFWVPSLRELTRDKPVDYVLSKGAKEFLDAYEKAIEALEGYAQEDKHVYTVIAGCTGGQHRSVAMSEELARLRA HGLNVTVSAR  
EQHKRHSS

>CALSAC\_ZP\_00884966  
MILLETIVITGMSGAGKSLAIRAFEDMGFFCIDNLPQPLKPIAELASASNDKISRIAAVIDIRGGELFDDFKDVLNLDLKGTYNFKVFLDAHDNVLVQRYKETRRKHP  
LSFESDGSILEAIQKEREKLEIKRYADFIIDTSTLSPRDLKELFEIFSAQRSRETMITVMSFGFKYGLPIADLVDFVRHLPNPHYIPHMKPLTGLDEEVSSYV  
DVTKEFLKFLDLILFLIPNYAEEGAQLVIAIGCTGGKHSVYIAEELFELIKNNGYKASIFHRDIEKDIK

# Anhang

>CARHYD\_YP\_359144  
MRFLVITGLSGAGKTQAMRALEDLGYFCVDNLPVLPMPKFAELVAHAENKIEKVALVVDVGRQKFFQDLWDALGELTKLGIKYEILFLARDEVLLKRFKANRRGHP  
LGVRSQILDNKKERKFLLENLRRADKVIDTSDLQPADLRNEILNYGEEQKRKISINIVTFGYKYGLPLDADLIMDVRFLPNPFYKELRPLSGSDKPVYDYVFN  
EVTKKFTEKFLDLIEFLMPFYQKEGKSNLVAIGCTGGRHRSVAIANFLARTLEEKNEYVYLRHRDLEKHREE

>CLOACE\_CAC0511  
MRFLVITGLSGAGKTQAIRSLEDLGYFCVDNLPPLIPKFAEQVCYESESKINKIALVIDIRGGEFFDNLFESLKYKAEAGYKYEILFLDADNEVLKRFKESRRKHPLAPN  
GRILNLIQMERSKYLKTLNMANVIDTSKATRELREKINSYQEEQGIKSLIVTVSFGFKYGIPIVSDLVDFVDFRFLPNPFYIPELKRFSGIEKPKVDYVMSFDQTK  
FVNKIEQLKFLIPNYLKEGKRLIVSIGCTGGRHRSVTIANEYERLKNIDGETVNIDHRDIEEDINKGGKLL

>CLOBEI\_ZP\_00909349  
MRFLVITGLSGAGKTQATRLEDLGYFCVDNLPPLIPKFAEACTQSGGNIKVALVIDIRGGIFFDDFEALNYLKNNEFKYEILFLDADNEVLKRFKESRRKHPLSP  
DGRVLTGITQEREKREVKNIADIIIDTSKYEIRHLREKINKNYGDHTYPEKQLSITVLSFGFKYGIPIVSDLVDFVDFRFLPNPFYIPELKYSGNDEPVDYVVKQEEETVN  
FIEKLDMLRYLIPNYKEGKSQLISIGCTGGRHRSVAIANEVYERLNKENYNSKIEHRDVAEDLHKGEKLL

>CLOPER\_CPE0354  
MRFLVITGLSGAGKTEATRLEDLGYFCVDNLPPLIPKFAEACVQSEKIDKIALVIDIRGGIFFDDLFESEIYKANDFNIEILFEASDEVLVKRFKESRRKHPLSPD  
GRIITGISEERMRLRELKDRADNIIDTSNYPIRNLREKINLLYGDGKPVQNLISITVLSFGFKYGIPIVSDLVDFVDFRFLPNPFYIPELKPFSGEDEPVDYVLAQEEETKGF  
LSRLSDMAEFLIPNYKEGKRLISIGCTGGRHRSVAIANALYKDLLCKNFHVTLLEHRDINEDINRGRDRKL

>CLOTET\_CTC02495  
MRFLVITGLSGAGKTQAIRSLEDLGYFCVDNLPPLIPKFAEACTDGRINKIALVIDIRGGEFFDNLFESLNYKIDQNYKYEILFEASDEVLVKRFKESRRKHPLSS  
GGRILNLIQALERSRKLKVKDVASNIINTSKFTNMDLRQEIITRYIGDGDQVEAQLTITVLSFGFKYGIPIVSDLVDFVDFRFLPNPFYIPELKNRFNSGNDKPVYDYVLEFNQTK  
EFIGKLDILEFLIPHYTEEGKRLVIAIGCTGGRHRSVSIANSIYKLEEKGHKVNIDHRDIEDNNKGGKLL

>CLOTHE\_UPF0042  
MRLLIITGISGAGKSLVVKYLEDIGFFCVDNLPPLIIGKFAEILCKSRGKISKVALVIDIRGGELFNDLVPELNLKESGIDYKYEILFEASDQVLKRYK  
ESRRIHPLAPEGRLIKGIKTEREILSQRKNATYIIDTSNLTPRQLKEELIAlFVEGRKFDGMIVNIISFGFKYGIPIEDCLVDFVDFRFLPNPFYIPELKYTKGDEEVRYVM  
SFAETAEMTKLDLVDFLIPNYKEGKSQLVIGVCTGGRHRSVAIEALFSLYLCGREHRVDFIDHRDIDKDRSNRR

>COLPSY\_CPS\_4546  
MKLIIVSGRSGSGKSVALRVEDLGYFCVDNIPINLLPALTHTVINDYENVAVSLDVRNLKPKDPEDIEPIIAYLPKAVDNTFLDADDNDLIRRFSETRRLHPLIKENMA  
LDQAIKLEKSLLEPISTNADLYINTSLSPLQADLVREIRLGGKGTSMVLVFESEFGFKHGIPVDADYVDFARFLPNPFWEKSLKQGTQVDEKDFLASQAVTKFIW  
QINSFMMTWPLHLERNRSYVIAIGCTGGKHSRVAIEMAKNFRKERDIDQTHHRDIDKST

>COREFF\_CE1710  
MNQTPGSTVPEATPTVTPASSPAPETTFTPVITGMSGAGLSTAARVLEDLGFVTHNLPPQMLPLVEMCAREDSPVDKVAVCDVRSREFRGGLERETILEE  
KNLAPTFLFDARDDELIRRFDNVRRTHPLQGSQTLQVGIERERQMLSDLKEEADVIDTSELVHDLRRAIESFRFIAKRQVQHVITIESFGFKHGSPRDADFIIDARF  
LPNPFVWPELRFPRGVDPKVSVDYVLSQKAGGFLDNFIAMLDMLPGYRHGKNFITVIGICTGGHRSVAVSEELARRLGERPDLVSVVHRDIRN

>DESBHF\_DSY4845  
MLSKQVRLVITGLSGAGKTQALQSLDQGYFCVDNLPPLIPKFAELCTQSGQKVTAAVCDLGRGGEFFSSLAELGDLHREGFHYEILFEASDEVLVGRYKES  
RRRHPLSPSGGILEGIQMERQMLTELGRVAHKIMDTSNLSSQQLRHLVAESFGNEQASGHAVSVVSGFKYAIPLDVLDDIDVDFRFLPNPFYVLAELRPLTGEHPQV  
QDYIFSNVAQEFVDKYLGLLEFILPYYVKEGKRHLVIGVCTGGQH RSVIAAERIG LFLQERSYMMSVKHRDAARNRKGDKSK

>DESRED\_UPF0042  
MSDSEGGVEVSSRLLIVTGMSGAGKTQAVQSLDGLGYFCVDNLPALIPKFAELVQSNGKVEKVALVVDIRGGAFFHQAEVHLHDLGEGYRFEVLEASDET  
VRRYKESRRRHPLDNHGEVLKVIQEEERELLREIRGRATKVIDTSNVSNQKLEQITQYGGDKENSRLITVISFGYKGIPIVSDLVDFRFLPNPFYIPELRLCTG  
NDEPQQHVMSSQDVTKFMEKLIDFVQFLVPHYQREGKATLMIAIGCTGGMHSRVTITNKLGEVLESEKGYRNVNRHRDIRV

>ENTSP\_ZP\_01590769  
MVLMIIVSGRSGSGKSVALRVEDLGMFYCVDNLPVLLPELARTLADRQISAAVSDVRNMPESPEVFEQAMSSLPETFTPOLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSS  
KNLSLESIADEESDILLEPLRSRDLIVDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVDFRFLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAFLDRHTE  
VHNFIYQTRSYLELWLPMLTENNRSYLVAIGCTGGKHSRVAIEQLADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRRK

>ENTCFAE\_EF0766  
MPENLQVITGMSGAGKTVAVQSFEDMGYFCIDNLPPLIPKFAEWELIKESGKVTKIALVIDLRSRTFFREIQDMLVELENTNFIDTITFLDADDEELVSRYKETRRAH  
MAMDGLVTEGIRKERAMLEEKADAQLVIDTDLSPRQLRERLNKELATRETHEFRVEMVSGFKYGLPIDADIVMDVDFRFLPNPHYIDELRPLTGMDDQPVYDYVMG  
PETDEFYTKFIDLLRTVLPYKKEGKSSVIAIGCTGGQHSRVALTERVGAELKEEDYHVNITHRDLRKRKETVNRS

>ENTCFAC\_UPF0042  
MTDNLQVITGMSGAGKTVAIQSFEDMGYFCIDNMPPLIPKFAEWELIKESGKVTKIALVIDLRSRFFEEIQNMLIEIENTNFIDTSILFLDASDEELVARYKETRAH  
PMAMDGLITEGIRKERAILDDLKAQASVIIDTTLTPRQLREKINESFKSGDQGFRIEFVSGFKYGLPIDSDIVMDVDFRFLPNPHYIPELRLTGMDDQPVYDYVMSFDE  
TQSFYHKLDDLLETVLPYKKEGKSSVIAIGCTGGQHSRVALTERLANALGKNYKVNTHRDKDKRKTETVNRS

>ERWCAR\_ECA0285  
MVLMIIVSGRSGSGKSVALRVEDLGMFYCVDNLPVLLPELANTLARNISAASVSDVRNMPESPEIFEHAMEQLPPSFSPQLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSS  
NLSLESIADEESDILLEPLRSRDLIVDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVDFRFLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAFLDRHTEVH  
NFYQTRSYLELWLPMLTENNRSYLVAIGCTGGKHSRVAIEQLADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRRKPS

>ESCCOLSP\_YHB  
MVLMIIVSGRSGSGKSVALRVEDLGMFYCVDNLPVLLPELARTLADREISAASVSDVRNMPESPEIFEQAMSNLPAFSPQLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSS  
KNLSLESIADEESDILLEPLRSRDLIVDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVDFRFLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAFLDRHTE  
VHNFIYQTRSYLELWLPMLTENNRSYLVAIGCTGGKHSRVAIEQLADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRRK

>EXISIB\_UPF0042  
MEQNQPQLVITGMSGAGKTVAAMNSFEDLGYFCVDNLPPLIPKFAEIVIGQVRPKIAVAIDTRARDFIDSFVYEDLKKTNLQIRMLYLDARNDVLRVRYKESRRSH  
PLAPTASPLIGIERERTLLEGRDKAQLLMDTSDIKPLALKERILKEFTGERIPFTVNVMSFGFKHGLPLDADLVDFRFLPNPFYIPELRLPMTGLDLEVSSYVMQWP  
EAKLFYKLVDMLEFLIPQYEREGKSQLVVALGCTGGKHSRITFAEAIKFEK NQYHIVTNHRDYVHAKEEK

>FUSNUC\_FN1089  
MKTKHIIITGLSGAGKTTALNILEDMSYITIDNPLGLEKSLDTEIEKLAVGDIRFTKNTKDFFTFINYIKESGVKMDIIFIEAHEAILGRYTLRRAHPLKEVTLRSILK  
EKKLFPPIREIADLVIDTTEIKTVELEKRFKFLAKDGENTDININIIQSFGYKGIPTDSDLVDFRFLPNPFYIPELRLPMTGLDLEVSSYVMQWP  
LIPQYKKEGKHLTISIGCSGGQHSRVTFNKLAEDLKNKSVLEYINVVSHREKELGHW

>GEOKAU\_GK3066  
MGQNGALQPIQLVITGMSGAGKTVAIQSFEDLGFCCVDNLPPLIPKFAELVYKESGKNMKNVALVMDLRSRDFDHLFAALDELAQEWVIPQVFLDAQDSTLVAR  
YKTRRTHPLAPNEPPELGERLKERLLEELKGRAQIYDITGLPRELREKIQRFSSHAQSGFTINVMVSGFKYGIPIVSDLVDFRFLPNPHYIEHMRPKTGLDDVS  
SYVLKWGETQKFLKLDLFLMPLPYQREGKSQLVIAIGCTGGQHSRVAIEYIARHFSDDYKTVSHRDMERRKDIHR

>GEOHE\_GTN\_3015  
MGQNGTVQPTQLVITGMSGAGKTVAIQSFEDLGFCCVDNLPPLIPKFAELVYKESGKNMKNVALVMDLRSRDFDHLFAALDELAQEWVIPQVFLDAQDSTLVA  
RYKTRRTHPLAPNEPPELGERLKERLLEELKGRAQIYDITGLPRELREKIQRFSSHAQSGFTINVMVSGFKYGIPIVSDLVDFRFLPNPHYIEHMRPKTGLDDE  
VSSYLVKWGETQKFLKLDLFLMPLPYQREGKSQLVIAIGCTGGQHSRVAIEYIARHFSADYKTVSHRDMERRKAEHR

>GLOVIO\_GLR4163  
MTSFSAPGSPVDVLLTSPAGAGRTEAIRIFEDLGYLCLNHVWPELVPTFLKHYAPIAPRLVCLASRPEADAQAGLIAARVALRSLARTTVHVLDCPEGVLLSRYA  
LTRRPHVFDHGKGLLAIRAERTALEPVRALADEVDTGPLELAQLRVHLGALVGRPTPELVTVMSFGFKRGPADQAQVLDIRFLPNPHYIPELRLPMTGLDLEVSSYVMQWP  
VAEYVASEQSAQYRSLLEFLRLLHQYRDRRSQLLIAIGCTGGQHSRVAIEYIARHFSADYKTVSHRDMERRKAEHR

>HAEDUC\_HD0584  
MELVIISGRSGSGKSVALRVEDLGYCVDNLPPLIPKFAELASFLASDCSAVSLDIRNFENLTRIDELLHQLSQLTINTKMFIDCESATLIRRYSDSRRLHPLSNQD  
LSLASEIENLTLDPRLRQADYLDITHTSSPHELAAANLRLHILRGSTEKELNIVFESFGFKYGLSADADYVDFRFLPNPHWHAELRAMTGLEQPVIDFLERQTEVHN  
FIYQTRNLETWLPMLTENNRSYLVAIGCTGGKHSRVAIEYIARHFSADYKTVSHRDMERRKAEHR

# Anhang

>HAEINF\_AAC22801  
MGKLMIIIISGRSGAGKSVLRALEDAGYYCVDNIPDLPLQTLTDLISQSSQSSVAISLDIRNIPNSAHSKQTLSTLQKHHQIKIFLEADRATLIRRYSDSRRLHPLSLK  
DLSLEAAIDEERYLPLELIQHANLIDTTLSTHSLAERLREFLRGNSEKELKIVESFGFKYGIPLDADYVDFVDFRFLPNPHWDPTRPMTGLEAPVAEFLNSHTEVNEF  
IYLTRHYDITWLPMLKNNRSYLTIAIGCTGGKHSRVYIAQQLEGEYFQAKGKTQIKHKSLEKNTK

>HAESOM\_ZP\_00132582  
MEIIISGRSGAGKSVLRALEDIGYYCVDNLTMDLVPQLVDMLENKQHLVAISLDIRNLPQEPETLDHILNLLQEKYYPVIFLTDNRNLTIRRYSDSRRLHPLSVQNL  
LEAAIAAEKHELEPLVQHANVIIDTTLSPHELAERLREFLRGNTEKELQIIVESFGFKYGIPLDADYVDFVDFRFLPNPHWQELRPMTGLEKPEVIEFMQKHIEVDNFYQ  
TRNYIENWLPMLKNNRSYLTIAIGCTGGKHSRVYIAQQIGEYFRAKGGKVKIQHKSLEKHTQNK

>HALORE\_UPF0042  
MQFLIVTGMMSGAGKSVLNFEDMGFFCIDNLPALISKFAELCLHSELDKIAVVDIRGREFFNALFSELSSLEKRGIDYEILFLEASDEVLIRRYKETRRLHPLDEEG  
RVLDAIRKERHLLLEIKGKANKIIDSLSKQELNHELKVVSYFQKQSMVTSIISFGFKYGIPLDADYVDFVDFRFLPNPHYVRSKERTGEETVVQDYILKWPVTKQF  
YKRFDDMMDFLPEYSREGKSHFTIAIGCTGGKHSRVTTAIKLEFLLSKGYHVVEHKDISK

>IDIBAL\_OS145\_05430  
MQLIIVSGRSGGKTIARVLEDLGFYCVDNLPISLLPTLVHAVIEQYQKIAISIDVRNLPEDSQELLESIDFLPAEVDIEVLFIDADDQTLQRFGETRRLHPLSQKQLP  
LLEALQLENRLLDPIAVRATWRIDSSLSLHLQLEEV SARVLGKASKQVIVFQSFQFKHGVKPKDADFVDFARILPNPHWQELKLLTGQDEDVKQFFRLESVTKY  
LLQVENFLATWLPYFRSNNRSYLTIAIGCTGGQHSRVYLAETLAEQFRSEGHTVQVRHRELS K

>IDILOI\_IL0393  
MQLIIVSGRSGGKTIARVLEDLGFYCVDNLPISLLPTLVHAVIEQYQKIAISIDVRNLPEDSQELLESIDFLPAEVDIEVLFIDADDQTLQRFGETRRLHPLSQKQLP  
LEALQAEHMKLEPIMERATWRIDSSLSLHLQLEEV SARVLGKASKQVIVFQSFQFKHGVKPKDADFVDFARILPNPHWQELKLLTGQDEDVKQFFRLESVTKY  
QLENFLDTWLPHFQRSNNRSYLTIAIGCTGGQHSRVYISQQLAEFERFEQAVKQVVRHRELSKTHG

>KLEPNE\_P17163  
MVLMIIVSGRSGGKSVLRALEDIGYFVDNLPVLLPELARSLADRNSIAAVSIDVRNMPESPEIFEQAMKNLPAEFSPOLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSS  
KNLSLESAIDEESSDLEPLRSRADLIVTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFEFSGFKHGIPIDYVDFVDFRFLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAALDRHTE  
VHNFIYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTIAIGCTGGKHSRVYIAEQQLADYFRSRGNVQSRHRTLEKRKS

>LACACI\_LBA0691  
MADEKQLLIVTGMMSGAGKTVAHADLEDMGYFVVDNLPPTLLGSFWDLNNNSDFHFKVAVVIDLRVKAIFYDILLDEVNSLEDNGNVQATILYDASDDVLVARYKET  
RRLPPLANNKGRLLDGIQEERILTPIKNRSYIVDTSNLSTKELKQKINTFSDDKRPQFSIEVMSFGFKYGMPIADIVMDVDFRFLPNPHYPELRFPTGLDKRVFDY  
VMNKEETQVYFKLLDMLTAIPGYIEGKELTIAIGCTGGQHSRVYIAEQQLARDLSKKYVPDITHREISRYRK

>LACBRE\_YP\_794827  
MTEDIRLVIITGMMSGAGKTVMQSFEDLGYFCVDNMPPLPKFWDLVRESGKLSKIALVIDLRSRAFYEIVRMLNDVAVHGTMMNAQVFLDASDAELVSRYKETR  
SHPLARNGRVLEGISRERELLAPIRQAALVIDTTLSRQLREKIFLNFKESGSPAFHIEVMSFGFKYGLPIDADIVMDVDFRFLPNPHYPELNRQTGMDDQPVYDVM  
NQPQTEEFYQRFGLLTTIVPGYKQEGKSSLTIAIGCTGGQHSRVALTQRGQALGNTYVPHVTHRDIEKRKESANRS

>LACCAS\_YP\_806200  
MTESDLVIITGMMSGAGKTVMQAFEDLGYFCVDNMPALLPKFWELVKEGSKITKVALVVDLRSRAFYDQIIDMLANLNDNNAYVHSRILFLDATDEELVSRYKETR  
SHPLAMEGRVMDGVRKERELLAPLDRASVYIDTSTLTPRELRESIFDKFETDQDETFHIEMLSFQFKYGLPIDADIVMDVDFRFLPNPHYKDYRPKTGLDPEVYNYV  
MDNEDAESFYNFYDLSSEIMPYKAEKTSVTIAIGCTGGQHSRVAFARIGKAFSDAYAVDITHRDIEKHKKE TVNRS

>LACDEL\_YP\_618706  
MIEFNVLWEQYGMHEKYYKQLLITGMMSGAGKTVAHSLVEDVGYFVVDNLPPELLGNFWDLMTSEDFEKVAVVIDLRVKSFYKDLIDEINSLEDGSGTQATVIFLE  
ASDDTLVARYKETRRLPLAENGRLLDGIQERILTPVRNRSYIYDTSKMTTKELKQKLSQKFGELHKKPKFGIEVMSFGFKYGMPIADIVMDVDFRFLPNPHYPEL  
PFTGLDKRVFNVMKDDETKVYFGKLLDLLTAIPGYIDEGKELTIAIGCTGGQHSRVYIAEQQLARDLSEKYPVDITHREISRYLRK

>LACGAS\_YP\_815115  
MAEQKQLLIVTGMMSGAGKTVAIKALEDMGYFVVDNLPPELLGSFWEINNSDFSKAAVVDLVRVKSFYKDLVDEIKSLEDGSGNQVSTVFLDASDDVLVARYKET  
RRLPPLAHTGRLLDGIQEERILSRKTNISNIIIDTSRLTKELKAKLVDFKGDNRTRTFISIEVMSFGFKYGIPIADIVMDVDFRFLPNPHYIPQLKPTGLDR  
RVFDYVMSKKEKTKFYAKFLDMLTAIPGYIAEGKELTIAIGCTGGQHSRVSIARQLAVDLAKKYPVDISHREISRYIGQ

>LACJOH\_LJ0866  
MAEQKQLLIVTGMMSGAGKTVAIKALEDMGYFVVDNLPPELLGSFWEINNSDFSKAAVVDLVRVKSFYKDLVDEIKSLEDGSGNQVSTVFLDASDDVLVARYKET  
RRLPPLAHTGRLLDGIQEERILSRKTNISNIIIDTSHLSTKELKTKLVDFKGDNRTRTFISIEVMSFGFKYGIPIADIVMDVDFRFLPNPHYIPQLKPTGLDRRVFDYVMS  
KKETKEFYAKFLDMLTAIPGYIAEGKELTIAIGCTGGQHSRVSIARQLAVDLAKKYPVDISHREISRYIGQ

>LACPLA\_LP\_0779  
MAESLQVHISGMMSGAGKTVAVQSFEDLGYFCVDNMPALLPKFSELVEESGKIKKVALVIDLRSRAFYEIMDMLANLNDTDFVSTRILFLDASNEELVSRYKETR  
HPLAMEGRVMDGVRKERELLAPLDRASVYIDTSTLTPRELRESIFDKFETDQDETFHIEMLSFQFKYGLPIDADIVMDVDFRFLPNPHYIPELKLLTGLDKPVADYVMQ  
QPATEAFYQQLSMLSEIMPGEAEGKSSLTIAIGCTGGQHSRVALTQRIGELAKHYKVHISHRDIEKRKTVNRS

>LACREU\_ZP\_01164767  
MRKEELVMVDKLLKVVIIITGMMSGAGKTVAHSLVEDLGYFVDNLPGLAERFVVIDESREFDKIAMVMDMRSRGFYDEVLNFEKLLKRAIDLKLLFLDANDVTLI  
SRYKETRRSHPLSPQGRILDGVELERKLDLKSQADIVDTTNPTRNLRLNKLFGHEGNDYFVEVMSFGFKYGLPIDADIVMDVDFRFLPNPHYIPELKHLTGND  
PAVQ NYVVMQSLAKEFYQHLSLEIALPGYIEGKSSLTIAIGCTGGQHSRVTIANKLSADLKEKGYKVNTYHRDIEKAK

>LACSAK\_YP\_395138  
MTDNLNVIITGMMSGAGKTVAIQSFEDLGYFCVDNMPPLPKFWELVKE SGKVTKIALV  
IDLRSRAFVD GHEMLSGLD NTOFVTTKIL FLDASDEELV SRYKETRRSH PLARNRGLMD  
GIHKERELLT EIRNQSQMVV NTSMLSPREL REQIFRVFKT SDNPSFHIEV MSFGFKYGLP  
IDADIVMDVR FLNPHYVVAE FKALNGLDKP VRDYVMEQPA TEKFYQQLTA LLSKIMPGYL  
KEGKTSVTIA IGCTGGQHSR VALAQRLLADD LAVDYPVDVT HRDMKRRKES VNRS

>LACSAL\_YP\_536062  
MFMSALQVIVTGMMSGAGKTVAVQSFEDLGYFCVDNMPKLLPKFYELVKEGSKITKIALVVDLRSRAFYEIVEMVRELDENEFNSSRILFLDASDEELVARYKET  
RSHPLAMEGRVLDGIHLERELLAPIKSNAQIIDSLSKSPRQLREEIFKNFEARDTKTFHIEVMSFGFKYGLPIDADIVMDVDFRFLPNPHYVSELNKTGKDDAVYEVVMK  
SEKTEEFYQKFSVLLKYVIPGYIAEGKSNVTIAIGCTGGQHSRVLAERIGNELSKYVPVHMSHRDMKRRKTVNRS

>LACTLAC\_L188550  
MENKLNIVITGMMSGAGKTVAIQSFEDMGYFTVDNMPNLIKEFVGLLNTPDNKIDKVALVDMRSRAFFEDIQSVITELTDNGSVNFKLLFLDANDTELVSRYKETR  
SHPLAIDGRITLDGITKEREIADLKNLSEVIDTSELTPRNLRARILQKFASTESTFRIEVMSFGFKYGLPLDADLVDFRFLPNPHYITELRDKNGTDEKVDYVMEH  
PQSEEFYENLMKMLVPILPAYKKEGKSVLTIAGCTGGQHSRVAFARVSAALKDKVHNLVSHRDKDRRKTVNRS

>LEIXYL\_LXX11490  
MTSDVETAEQEVLTIVTGMMSGAGRSTVANALEDLWYVVDNLPQMLRPLIELANRAESGLPRIAAVVDVGRNFFADLQEMIQSLREGTKVRLVFLAADVTLV  
RRFEQVRRPHPLQNGTLLDGIATERARLREIRESSDIIVDTSDLNIIHQLATRIDIFADENTADQVTVMSFGFKYGLPADADLVADARFLPNPHYKPELRYPTGLD  
EVVRNDVLQNGAAEFIESYLEALRPIFAGYQRENKRHATIAVGCTGGKHSRVIAEELAAARLRLPGLAVSIKHRDLGRE

>LISINN\_LIN2617  
MASKQLKLVITGMMSGAGKTVMQSLLEDLGYFCVDNLPPLPKFWELMKESDKMDKIALVMDLGRFFDSIEPALDELNTNFITTKILFEADDKVLVSRYKETR  
RHHPLPENGSVLDGINAERELLSDLKGRSQLVINTSNMAPRELREINNEFQTEDKDFVFNQVLMVMSFGFKYGIPIADLVDFRFLPNPHYDKMRPLTGLDEDVYEV  
VMKWP ETMAFLDKLVDLLMFTLPFYKREGKQLVIAIGCTGGQHSRVALTTEYVGKAIQKQYETTISHRDMKRRKER

>LISMON\_SP.  
MASKQLKLVITGMMSGAGKTVMQSLLEDLGYFCVDNLPPLPKFWELMKESDKMDKIALVMDLGRFFDSIEPALDELNTNFITTKILFEADDKVLVSRYKETR  
RHHPLPENGSVLDGINAERELLSDLKGRSQLVINTSNMAPRELREINNEFQTEDKDFVFNQVLMVMSFGFKYGIPIADLVDFRFLPNPHYDKMRPLTGLDEDVYEV  
MKWPETQFTDLKLVDLLMFTLPFYKREGKQLVIAIGCTGGQHSRVALTTEYVGKAIQKQYETTISHRDMKRRKER

>LISWEL\_LWE2422

## Anhang

MASKQLKLVITGMSGAGKTVAMQSLDLYGFCVDNLPSPKFWELMKESDKMDKIALVMDLRGREFFDSIEPALDELNTNFITTKILFLEADDKVLVSRYSKETR  
RHHPLEPNGLVDGINAERELLSDLKGRSQLVINTSNMAPRELREINNEFQTEKDFVFNVQLMSFGFKYGIPIADLVDFVDFRFLPNPHYIDKMRPLTGLDKDVEY  
VMKWP ETGAFDLKIDLLMFTLPHYKREGKTLVIAIGCTGGQHRVALTEYVGAQIKQKYETTISHRDMKRRKGR

>MANSUC\_MS1718  
MRQFMELIISGRSGKSVLRALEDMGYICVDNLPINLLPELADILSTSQSAAVSLDIRNLPHPETLDTLLQQLADAHQVRIIFLEADRSTLIRRYSDSRRLHPL  
SMQDL SLEAAIEAEGYLEPQLQNAELVINTSEJSTHELAQRLREFLKGPDKELKIVVESFGFKYGLPLDADYVDFVDFRFLPNPHWNPDLRPMTGLDQPVDFLKGYS  
EV NNFYSTRNYLETWLPMLQNNRSYLTIAIGCTGGKHSRVSIAEQLEGFYQAKGKVKIQHKSLEKHHKNSA

>MARAQU\_UPF0042  
MKLIIVSGRSGSGKSTALHVLLEDLGYFCIDNLPGLLFLPTREAAEQEAPGRKMKMAVSDARNLSAELANFETIYQQLKQTVGELEIIFLDADEQSSLQRFHATRKRHP  
LSDDKTSLREAITNEKQLLEPLSKLADLYVNTTGLSMYELRDMIKQVAGRKDQELALLFQSFQFKHGVVDSYVDFVDFRFLPNPHYWDTSLRKHGTVDQPVDFLE  
REPLTRQMVDLTLGFLNTPSFADSNRSYMTISIGCTGGQHRSVYVCEQLGRYFRDNRYRNVQVRHTELPHLQARGEI

>MOOTHE\_YP\_429136  
MPETKYPRLVITGLSGAGKTQAVRCLLEDLGFCCVDNLPSPKFWELMKESDKMDKIALVMDLRGREFFDSIEPALDELNTNFITTKILFLEADDKVLVSRYSKETR  
KETRRRHPPLSSGGQILEGIEERRRLEELRGRASKIIDTSELTPRQLKEQVSELFQSSORRLVSIISFGYKYGIPLDADLVDFVDFRFLPNPHYWDTSLRKHGTVDQPVDFLE  
VMASPVTRQFIEQFAALLRFLIPHYLQEGKSHLVVIAIGCTGGQHRSVTLANKLQELLQGENYSVTVKHRDVRVYVSTGNRR

>MYCSME\_MSMEG3088  
MSEMNRNSSGVSQSGASEKDGVESHEGIDVVLVTGLSGAGRGTAAKVLLEDLGYVADNLPPELIARMVDLGLAAGSRITQLAVVMDVRSKGFGLDLDWVRNEL  
ATRNIAPRVLFMEASDDILVRRYEQNNRSHPLQGTQTAEGLAERAMAPVRAAADLVIDTSTLPVPALRESIERAFGGTETVAYTNVTVESFGFKYGLPMDADTVM  
DVRFLPNPHWVDELPRHSGHQHPDRDYVLGQPGALEFLDTHYRLLDVIDGYRREGKRYMTVAIGCTGGKHSRVAIEALAEALLEGDDGLTVRHLRDLGRE

>MYCTUBCDC1551\_MT1464  
MMNHARGVENRSEGGIDVVLVTGLSGAGRGTAAKVLLEDLGYVADNLPPLQITRMVDFGLAAGSRITQLAVVMDVRSRGFTGLDLSVRNELATRAITPRVVFME  
ASDDTLVRRYEQNNRSHPLQGEQTLAEGIAAERRMLAPVRATADLIIDTSTLSVGLRDSIERAFGGGATTSTVTVESFGFKYGLPMDADMVMDVRFPLPNPHWV  
DELPLTGHQPAVRDYVLRHPGAAEFLESYHRLSLVVDGYRREGKRYMTIAIGCTGGKHSRVAIEALMGLLRSDQQLSVRALHRLDLGRE

>MYCTUBH37RV\_RV1421  
MMNHARGVENRSEGGIDVVLVTGLSGAGRGTAAKVLLEDLGYVADNLPPLQITRMVDFGLAAGSRITQLAVVMDVRSRGFTGLDLSVRNELATRAITPRVVFME  
ASDDTLVRRYEQNNRSHPLQGEQTLAEGIAAERRMLAPVRATADLIIDTSTLSVGLRDSIERAFGGGATTSTVTVESFGFKYGLPMDADMVMDVRFPLPNPHWV  
DELPLTGHQPAVRDYVLRHPGAAEFLESYHRLSLVVDGYRREGKRYMTIAIGCTGGKHSRVAIEALMGLLRSDQQLSVRALHRLDLGRE

>NITEUR\_NE1849  
MQEIIISGLSGSGKSIKLVLEDGYICVDNLPASLLVVLINLHQTQQHAYVAVIDMRSGENITVLPWQLKMDKSIQIKIFLEARTETLMQRFSETRRRHPPLSDKNIT  
LEEAIIRREALATLTLGHHIDTSSLRPNVLRFAIKDFIADSRSPQLTLLFQSFQYKGIPLDADLVDFVDFRFLPNPHYWDTSLRKHGTVDQPVDFLE  
DISSFLGTWLPAYIRDNRAYLTVIAIGCTGGQHRSVYFAEKALHFLHDSAHVLRHRGLAEYKPHYARR

>NOCFAR\_NFA358930  
MTRVESNNTASQAPPSGAGTLEQQEVVITGLSGAGRGTAAKVLLEDLGYVADNLPPELIGRMVLEGAAADPPIRRALVMDVRSRFFTGDLSSVADQLRALGL  
RTRVLFLEASDDVLRIRRFGRARRHPQSESADGTL SAGIAVERVRLAGVKAADLVIDTSTLSVGLRDSIERAFGGGATTSTVTVESFGFKYGLPMDADMVMDVRFPLPNPHWV  
DELPLTGHQPAVRDYVLRHPGAAEFLESYHRLSLVVDGYRREGKRYMTIAIGCTGGKHSRVAIEALMGLLRSDQQLSVRALHRLDLGRE

>OCEIHE\_OB2468  
MNQEQETKLVITGMSGAGKTVAIQSFEDLGYICVDNLPALLPKFLDLMDKATNIIQKVALVMDLRGREFFDSIEPALDELNTNFITTKILFLEADDKVLVSRYSKETR  
TRRSHPLATDGLDGKQERIEDELGRQAIIIDTSLKPRNLREKIKVYKEEQEVSVFVFSFGFKYGLPIDADLVDFVDFRFLPNPHYWDTSLRKHGTVDQPVDFLE  
KWSDTQTFIDKVTDLTFLMPLQYKKEGKSQLVVAIGCTGGQHRSVLAEHFSKVLNSGYTTHVSHRIDDKRKVL

>PASMUL\_PM0169  
MEIIISGHSAGKSVLRALEDLGYICVDNLPDLPLQASLSTNQSVASISLDIRNLPSSKTLNLLTEVQQHQIKLIFLADDRGTLIRRYSDSRRLHPLSTQDLSL  
EAADAERKYLDPLTQHADLIIDTTRLSSTHELAERLDFLCEKSDKALKIIFQSFQYKGIPLDADLVDFVDFRFLPNPHWVDELPLTGLDAPVAEFLNKQNEVNHFIYLT  
RNYIETWLPMLQNNRSYLTIAIGCTGGKHSRVSITQLEGFYQAKGKVKIQHKSLEKHHKNSA

>PEDPEN\_YP\_803988  
MNERLQFVVITGMSGAGKTVAMQSFEDLGFCCVDNMPALLPKFWELIKENGKISKVALVVDLRSRGFYDQILGLLGEQHNKIDTVDVFLDADTEELVARYKET  
RRAHPLAMDGRVADGRKERELLSPIKSEAQIVIDTNTMTPRELRSDFIFGHFTNKTIKPHIEVVSFGYKYGSPIDADIIMDVRFLPNPHYWDTSLRKHGTVDQPVDFLE  
MNQPAATEEYFDYLLKMLDIMPYQKEGKSNLTVIAIGCTGGQHRSVIAERLAKDLKSKYVNTNISHRDAHKKRKTENRS

>PHOPRO\_PLU4044  
MQLMIVSGRSGSGKSVLRALEDLGYICVDNLPVTLTLPQFISTVENNEQDIASIDVNRNMPSESGVIQKTLNSLDDKLDINVFIDADDKELVKRYSETRRLHPLSKH  
DMSLEQAIQSESAIVADIKHADLVIDTNNKSIHDLSETVRARVLRGSRKLLVLFESFGFKHGLPTDADYVDFVDFRFLPNPHWVPELKPQTGLDQVEKFLVGHAEVN  
KLIIYQIRNFIEWLPLEKNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVIAEQQLADHFLHDGQQVQIRHRTLE SK

>PHORLUM\_PLU4044  
MVLMIIVSGRSGSGKSVLRALEDMGYICVDNLPVLLPELANLADRDISAAVSDVNRNMPSEPEVFEALTKLPASFSPQLLFLDAERNTLIRRYSDTRRLHPLSSK  
NLSGSAIQAESQLLAPIERADLYIDTQLSIHQALAEVLRERILGKSSRLVLFESFGFKHGIPKDADYVDFVDFRFLPNPHWVPELKPQTGLDQVEKFLVGHAEVN  
NFYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTIAIGCTGGKHSRVSIAEQQLADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRR

>PROMIR\_AAC64575  
MVLMIIVSGRSGSGKSVLRALEDMGYICVDNLPVLLPELANLADRDISAAVSDVNRNMPSEPEVFEALTKLPASFSPQLLFLDAERNTLIRRYSDTRRLHPLSSK  
NLSGSAIQAESQLLAPIERADLYIDTQLSIHQALAEVLRERILGKSSRLVLFESFGFKHGIPKDADYVDFVDFRFLPNPHWVPELKPQTGLDQVEKFLVGHAEVN  
NFYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTIAIGCTGGKHSRVSIAEQQLADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRR

>PSEATL\_UPF0042  
MKLIIISGRSGSGKSVLRALEDLGYICVDNIPVLLPDLARTLADRQISAAVSDVNRNMPSEPEVFEALTKLPASFSPQLLFLDAERNTLIRRYSDTRRLHPLSSK  
NLSGSAIQAESQLLAPIERADLYIDTQLSIHQALAEVLRERILGKSSRLVLFESFGFKHGIPKDADYVDFVDFRFLPNPHWVPELKPQTGLDQVEKFLVGHAEVN  
QIQLNLISTWLPHLERNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYVEMLAKFTSTHPDVQIRHRELN

>PSEHAL\_PSHAA2554  
MELIISGRSGSGKSVLRALEDLGYICVDNIPVLLPDLARTLADRQISAAVSDVNRNMPSEPEVFEALTKLPASFSPQLLFLDAERNTLIRRYSDTRRLHPLSSK  
PLDLAIAKKEKLLDVLVTRADHVIDTDLVSVHQLAESMRETLGKDKQLIITFESFGFKHGIPKDADYVDFVDFRFLPNPHWVPELKPQTGLDQVEKFLVGHAEVN  
WQIQTFVQWTLPHLERNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYLAQTIGESFAMSHPNVKIRHREKQ

>PSETUN\_PTD2\_17262  
MELIISGRSGSGKSVLRALEDLGYICVDNIPVLLPDLARTLADRQISAAVSDVNRNMPSEPEVFEALTKLPASFSPQLLFLDAERNTLIRRYSDTRRLHPLSSK  
LDAIAKKEKLLDVLVSRADIIIDTDLVSVHQLAESMRETLGKDKQLIITFESFGFKHGIPKDADYVDFVDFRFLPNPHWVPELKPQTGLDQVEKFLVGHAEVN  
QTFLOQWTLPHLERNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYLAQTIGESFAMSHPNVKIRHREKQ

>SALENTATCC9150\_YHBJ  
MVLMIIVSGRSGSGKSVLRALEDMGYICVDNLPVLLPDLARTLADRQISAAVSDVNRNMPSEPEVFEALTKLPASFSPQLLFLDAERNTLIRRYSDTRRLHPLSSK  
KNLSLESADKESDILLEPLRSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPKDADYVDFVDFRFLPNPHWVPELKPQTGLDQVEKFLVGHAEVN  
VHNFIYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTIAIGCTGGKHSRVSIAEQQLADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRR

>SALENTTY2\_T3240  
MVLMIIVSGRSGSGKSVLRALEDMGYICVDNLPVLLPDLARTLADRQISAAVSDVNRNMPSEPEVFEALTKLPASFSPQLLFLDAERNTLIRRYSDTRRLHPLSSK  
NLSLESADKESDILLEPLRSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPKDADYVDFVDFRFLPNPHWVPELKPQTGLDQVEKFLVGHAEVN  
VHNFIYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTIAIGCTGGKHSRVSIAEQQLADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRR

>SALTYP\_YHBJ  
MVLMIIVSGRSGSGKSVLRALEDMGYICVDNLPVLLPDLARTLADRQISAAVSDVNRNMPSEPEVFEALTKLPASFSPQLLFLDAERNTLIRRYSDTRRLHPLSSK  
KNLSLESADKESDILLEPLRSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPKDADYVDFVDFRFLPNPHWVPELKPQTGLDQVEKFLVGHAEVN  
VHNFIYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTIAIGCTGGKHSRVSIAEQQLADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRR

>SERPRO\_ZP\_01538297



# Anhang

MVLMIVSGRSGSGKVALRA LEDMGFYCVD NLPVLLPQL ANTLAERNSS AAVSIDVRNM  
PESPEVFEYA MTQLPDSFSP QLLFLDADRNL TLRYSRSDTR RLHPLSSKNL SLESAIDEE  
DLLEPLRSRA DLIIDTSEMS VHELAEMLR RLLGKREREL TMVFESFGFK HGIPIDADYV  
FDVRFPLNPH WDPKLRPMTG LDKPVASF LD RHEVHNFIY QTRSYLEQWL PMLTNNRSY  
LTVAGCTGG KHRSVYVAEQ LADYFRSRGK NVQSRHRTLE KRKQ

>SHEAMA\_SAMA\_3091

MKLIVSGRSGSGKVALRVEDLGYCVDNLPQLIGPLLAQLKGNNDKVAISIDIRNMEPEQEKALEKELARLPEGVELTSFFLNSSDKVLLKRYSETRRLHPLSRS  
KVSLEAIKLEGGKMLAPISNMVDHFIDTSNLNVEYLADAVRQILLGRDKELVIIFESFGFKHGMPTADFMFDFRFLPNPHWEPELRLPTGLDEPVKFLERQVLVN  
KYIWQIENLLETWLPHLERNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYIAEQAKRFFANSHHKVEARHRELNKA

>SHEBAL\_UPF0042

MKLIVSGRSGSGKVALRVEDLGYCVDNLPQLIGSLLQLKGSNDLVAISVDVRNMPQDKVLVKQLASLPDTELTSSFFLNSSDKILLKRYSETRRLHPLSRS  
QVSLQEAIKLEGLKLEPMKLVHDYIDTSNLNIYDLSQVQRILLGSVDKELVINFEFSGFKHGMPTADFMFDFRFLPNPHWELARLPTGLDEPVAEFLNRQPLVN  
KFIWQIENLLETWLPHLERNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYIAEQAKRFSNGKHVKYARHRELNKA

>SHEDEF\_UPF0042

MKLIVSGRSGSGKVALRVEDLGYCVDNLPQLIGSLLQLKGSNDLVAISVDVRNIAEQGKVLQQLALLPETEISSFFLNSSDKVLLKRFSETRRLHPLSRSQ  
MSLQEAIKLEGRLLLEPIAKMVDHIDTSLNVEYLSDQVQRILLGSVDKELVINFEFSGFKHGMPTADFMFDFRFLPNPHWETELRPTGLDVPVQEFARQPLVHK  
LIWQIENLFETWMPHLERNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYIAEQAKRFSNGKHVKYARHRELDVKA

>SHEFRI\_UPF0042

MKLIVSGRSGSGKVALRVEDLGYCVDNLPQLIGTLLAQLKGSNDLVAISVDVRNIAEQGKVLQDQLALLENDTEISSFFLNSSDKVLLKRYSETRRLHPLSKNHI  
SLQEAIKLEGRLLLEPIAKIVDHYIDTSALNIYELSDQVQRILLGSVDKELVINFEFSGFKHGMPTADFMFDFRFLPNPHWELRPTGLDEPQVFLGRQPLVNFKFI  
QIENLFETWMPHLERNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYIAEQAKRFRQGSKHTVNRHRELNISDTNN

>SHELOI\_UPF0042

MKLIVSGRSGSGKVALRVEDLGYCVDNLPQLMMESLLEQLKGRSDLVAISVDVRNMPSEEIQLEKQAKLPKDTEILSFFLNSSDNVLLKRYSETRRLHPLSR  
SKVSLKEAIQLEGLKLDPIAKLVHDYIDTSNLNIYELSDQVQRILLGSVDKELVINFEFSGFKHGMPTADFMFDFRFLPNPHWETELRPTGLDEPQQFLSQPLVN  
KFIWQIENLLETWLPHLERNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYIAEQAKRFRQGSKHTVNRHRELNKHD

>SHEONE\_SO3964

MKLIVSGRSGSGKVALRVEDLGYCVDNLPQLIGSLLQLKGSNDLVAISVDVRNPEQDKVLVKQLASLPEGTELTSSFFLNSSDKVLLKRYSETRRLHPLSRS  
RVSLEAIKLEGLKLEPMKLVHDYIDTSNLNIYELSDQVQRILLGSVDKELVINFEFSGFKHGMPTADFMFDFRFLPNPHWELRPTGLDEPVAEFLNRQPLV  
NKFIWQIENLLETWLPHLERNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYIAEQAKRFSNGKHVKVNRHRELSHAKA

>SHEPUT\_UPF0042

MKLIVSGRSGSGKVALRVEDLGYCVDNLPQLIGSLLQLKGSNDLVAISVDVRNMPQDKVLVQQLSNLPAGTEITSFFLNSSDKVLLKRYSETRRLHPLSRS  
RVSLEAIKLEGLKLEPMKLVHDYIDTSNLNIYELSDQVQRILLGSVDKELVINFEFSGFKHGMPTADFMFDFRFLPNPHWELARLPTGLDEPVAEFLNRQPLVN  
KFIWQIENLLETWLPHLERNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYIAEQAKRFSNGKHVKVNRHRELDNAKA

>SHEWOO\_UPF0042

MKLIVSGRSGSGKVALRVEDLGYCVDNLPQLPMDTLEQLKSTDELVAISVDVRNMHETELDKQLSNLPEGTELTSSFFLNSSDEVLLKRYSETRRLHPLSRSK  
TSLKEAIDHERILLEPVSCLVDHYIDTSNLNIYDLSNQVREILLGSVDKELVINFEFSGFKHGMPTADFMFDFRFLPNPHWELRPTGLDEPQVFLSQPVTNK  
FIWQIENLLETWLPHLERNNRSYLTIAIGCTGGQHRSVYIAEQAKRFSNGKHVKVNRHRELSND

>SHIFLE\_YHB

MVLMIVSGRSGSGKVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPDLARTLADREISAASVSDVRNMPESPEIFEQAMSNLPDAFSPQLLFLDADRNTLRYSRSDTRRLHPLSS  
KNLSLESAIDKESDLEPLSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRFPLNPHWDPKLRPMTGLDKPVAALDRHTE  
VHNFIYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTIAIGCTGGKHRSVYIAEQADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRKQ

>SODGLO\_SG0196

MVLMIVSGRSGSGKVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLASALASANISAAVSDVRNMPESPEIFEQAMDNLPAQAFAPQLLFLDADRNTLRYSRSDTRRLHPLSA  
LNLSESAIDEDSLEPLSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRMLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRFPLNPHWDPKLRPMTGLDRPVAALDRHTE  
VHNFIYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTIAIGCTGGKHRSVYIAEQADYFRSRGKNAQSRHRTLEKRSK

>STAAUR\_SP

MDNNEKEKSKSELLVVTGLSGAGKSLVIQCLEDMGYCVDNLPVLLPKFVLMQGNPSLRKVAIAIDLRGKELFNSLVAIVDKVKSSEDVIDVMFLEASTEKLISR  
YKETRAHPLMEQGGKRLINAINDEREHLSEIRSIANVIDTTKLPKELKIRIRYDEEETFETTINVTSGFKHGQMDADLVDFVRFPLNPHYVVDLRLPTGLDK  
DYNYVMKWKETIIFEKLDLDFMIPGYKKEGKSQLVIAIGCTGGQHRSVYIAEQADYFRSRGKNAQSRHRTLEKRSK

>STAEPL\_SE0548

MTSNEKEMGKSELLVVTGMSGAGKSLVIQSLQLEDMGYCVDNLPVLLPKFVLMQGNPSLRKVAIAIDLRGKELFNSLVAIVDKVKSSEDVIDVMFLEASTEKLISR  
KESRRAHPLNEGGQRLIDAINEREHLSEIRSIANVIDTTKLPKELKIRIRYDEEETFETTINVTSGFKHGQMDADLVDFVRFPLNPHYVVDLRLPTGLDK  
YNYVMKWKETIIFEKLDLDFMIPGYKKEGKSQLVIAIGCTGGQHRSVYIAEQADYFRSRGKNAQSRHRTLEKRSK

>STAHAE\_SH2124

MTNHKENEMSKSELLVVTGLSGAGKSVVIQLEDIGYFCVDNLPVLLPKFVLMQGNPSLRKVAIAIDLRGKELFNSLVAIVDKVKSSEDVIDVMFLEASTEKLISR  
YKESRRAHPLNENGQMSLMSILEEKQLSNIRTIANYIDTTKLPKELKARVKEKFEDEFKFSINVSFGFKHGQMDADLVDFVRFPLNPHYVVDLRLPTGLDK  
EPVYHYVMKWKETIIFEKLDLDFMIPGYKKEGKSQLVIAIGCTGGQHRSVYIAEQADYFRSRGKNAQSRHRTLEKRSK

>STASAP\_SSP1952

MQPDEKEIVKSELLVVTGLSGAGKSVVIQSLQLEDMGYCVDNLPVLLPKFVLMQGNPSLRKVAIAIDLRGKELFNSLVAIVDKVKSSEDVIDVMFLEASTEKLISR  
YKESRRAHPLNENGQMSLMSILEEKQLSNIRTIANYIDTTKLPKELKARVKEKFEDEFKFSINVSFGFKHGQMDADLVDFVRFPLNPHYVVDLRLPTGLDK  
AVYKVMKWKETNIFYEKLDLDFMIPGYKKEGKSQLVIAIGCTGGQHRSVYIAEQADYFRSRGKNAQSRHRTLEKRSK

>STRAGA\_GBS0576

MSDEQIKLVITGMSGAGKVAIQSFEDLGYFTIDNMPPTLPKFLLEAAQSGDTSKIAMVDMRSRFFREINSILDSLEINDNINFILFLDADTELVSRYKETRRS  
HPLAADRGRVLDGIRLERELLAPLKSMSQNVVDTSELTTPRQLRKTISDQFSVEKQTSFRLEVSFGFKYGLPLDADLVDFVRFPLNPHYVVDLRLPTGLDK  
MSFDESDDFYDHLALIPKIPGYQNEGKSVLTVAGCTGGQHRSTFAHRLSEDLKADWTVNESHDRKNNRKTETVNR

>STRMUT\_SMU\_1306C

MSEKKIDLIVITGMSGAGKVAIQSFEDLGYFTIDNMPPTLPKFLLEVESSGENDKVALVDMRSRFFKEVSSILDKIDLNINFRILFLDADTELVSRYKETRRS  
HPLATTGRVLDGIRLERELLAPLKSMSQNVVDTSELTTPRQLRKTISDQFSVEKQTSFRLEVSFGFKYGLPLDADLVDFVRFPLNPHYVVDLRLPTGLDK  
MQHQESEEFYQHLALLAPLPYQKEGKSVLTVAGCTGGQHRSTFAHRLAQDLQGNWTVNESHDRKNNRKTETVNR

>STRPNE\_SP1566

MTKQQLHLVITGMSGAGKVAIQSFEDLGYFTIDNMPPTLPKFLLEVEIKEDNPKLALVDMRSRFFSEIQAVLDELENQDGLDFKILFLDAADKELVARYKETRR  
SHPLAADGRILDGIRLERELLAPLKSMSQNVVDTSELTTPRQLRKTISDQFSVEKQTSFRLEVSFGFKYGLPLDADLVDFVRFPLNPHYVVDLRLPTGLDK  
MNHPESEDFYQHLALIEPILPSYQKEGKSVLTVAGCTGGQHRSTFAHRLAQDLQGNWTVNESHDRKNNRKTETVNR

>STRPYO\_SP

MSDKHINLVITGMSGAGKVAIQSFEDLGYFTIDNMPPTLPKFLLEIEQTNENRRVALVDMRSRFFKEINSTLDSIESNPSIDFWILFLDADTELVSRYKETRRS  
HPLAADGRVLDGIRLERELLAPLKSMSQNVVDTSELTTPRQLRKTISDQFSVEKQTSFRLEVSFGFKYGLPLDADLVDFVRFPLNPHYVVDLRLPTGLDK  
MSPHESEFVYKHLNLVILPAYQKEGKSVLTVAGCTGGQHRSTFAHRLAQDLQGNWTVNESHDRKNNRKTETVNR

>STRSAN\_YP\_001034791

MSEKKIQLVITGMSGAGKVAIQSFEDLGYFTIDNMPPTLPKFLLEIEQTNENRRVALVDMRSRFFLQIQNVLEDEQENIDFKILFLDAADKELVARYKETRR  
SHPLAADGRILDGIRLERELLAPLKSMSQNVVDTSELTTPRQLRKTISDQFSVEKQTSFRLEVSFGFKYGLPLDADLVDFVRFPLNPHYVVDLRLPTGLDK  
MNHAESEEFYKHLNLVILPAYQKEGKSVLTVAGCTGGQHRSTFAHRLAQDLQGNWTVNESHDRKNNRKTETVNR

>STRSUI\_UPF0042

MSDKLHLVITGMSGAGKVAIQSFEDLGYFTIDNMPPTLPKFLLEIRHSQDNKIALVDMRSRFFSEIREVLEIEGAEDLDFKVLFLDADTELVSRYKETRRS  
HPLAADGRVLDGIRLERELLAPLKSMSQNIIDTTELTTPRQLRKTISDQFSVEKQTSFRLEVSFGFKYGLPLDADLVDFVRFPLNPHYVVDLRLPTGLDK  
EHQESEEFYKHLNLVILPAYQKEGKSVLTVAGCTGGQHRSTFAHRLAQDLQGNWTVNESHDRKNNRKTETVNR

# Anhang

>STRTHE\_STR0831

MKTKIINLVVVTGMSGAGKTVAIQSFEDIGYFTIDNIPPSLVKVIELLKHSEETDKIALVVDMSRVRFFDEINDILDQLESNEKLNFKILFLDADTGDGELVSRVYKETRNRSH  
PLAADGRVLDGIKLERELLSPLKSLSQNVDTTKLTPRQLRKAISEQFSSKQDQSSFRIVLVSFGFKYGLPLDADLVDFVDFRFLPNPYYDPTLRNLTLGLDKEVYDFVMT  
HKESDFYKNLNHLIKPILPGYQKEGKSVLTIAGCTGGQHRSVFAFHRAQLDKNDWTVNETHRDKDRRKETVNR5

>STPAVE\_SAV6292

MTEHEERQEERSAQGQEAHKESEDQAPQQAQENGAQVSTGIETAGVPDAVPELVIISGMSGAGRSTAAKCLLEDLGFVVDNLPALIPMTVELGARSQGNVA  
RIAVVVDVGRRRFFDNLRSLADLESKNVTRRIVFLESSDEALVRRFESVRRPPLQDGRIVDIDAERELLRELRGDADLVIDTSSLNVHELRAKMDAQFAGDEE  
RELRAATVMSFGFKYGLPVDADLVDMRFLPNPHWPELRPFTGLNEEVSAVFNQPGAQKFLDRAELLRLIAAGYREGKRYVTIAVGCTGGKHRSVATSEKLA  
RLAEGVETVVHDMRGRE

>SYMTHS\_STH186

MMDVDRSIRLVIVTGMMSGAGKTVQALKYLEDLGFVVDNLPPLMPLKLAELFGQTEGKVSRLALGIDIRGGRRFFHEILGALRQIAEIGVAYQILFMDASDEVLRVRYKE  
TRRRHPLAAQGRVLDGIQRERRLLQELRGLATFIIDTTHMTPADLRKELNRRFGQDRESPHFHVNVSFGFKHGAVALDADLVDFVDFRFLPNPYYDPTLRNLTLGLDKEVYDFVMT  
VVEYVMKWNVITQGFYRRLTGLIGFLPHYVAEGKSLTIAIGCTGGKHRSVCLANLRAHWIRERGVSVSEHRDMPRPADRSDEEEQP

>THETHE\_TTHA0319

MRFVLVTGLSGAGKTTARGFLEDLGYFMVDNLPPLRVLPLLQEAARGLARVGVVVDARALAFFQDLEEVLEALRPTVVYLEARPEVLLRRLYRNLTRRVHPLGAGNL  
MREIAEERRALAGLRGRAHLVVDTSSELSPRGLKEALRFLGEEGFLRLRLVVSFGFKWGPQADLVLDVRLPNPHYDPAALRPTGLDPEVRRYVFEAAEPPYR  
ALLAVAGLAAEGARAEGRAFYTAVGCTGGHRHSVAERLAELSGRAVEVHHRDVE REG

>THERETH\_UPF0042

MRFVIITGLSGAGKTVQALKAMEDMGFFCIDNFPALLPKLADLFYHKNVDKVALGMDLRGGQFFEDIYSSLEFLKKNNDYDIEIVFEASDEVLIKRFKETRNRKHPLS  
EEGRIVDGINEERKRLAEIRKIANSIIDSNTLSSQLKEELSNIFLKGKFKGIIIDIMSFYKYGIPLDADLVDFVDFRFLPNPYYDPTLRNLTLGLDKEVYDFVMT  
LKLGDMIKFLIPYVIREGKSQLVIAIGCTGGKHRSVTIANALYEFLLKEDYSVILHHRDIGEE

>THERTEN\_TTE1834

MRFVIITGLSGAGKTVQALKAMEDMGFFCIDNFPALLPKLADLFYHKNVDKVALGMDLRGGQFFEDIYSSLEFLKKNNDYDIEIVFEASDEVLIKRFKETRNRKHPLS  
EEGRIVDGINEERKRLAEIRKIANSIIDSNTLSSQLKEELSNIFLKGKFKGIIIDIMSFYKYGIPLDADLVDFVDFRFLPNPYYDPTLRNLTLGLDKEVYDFVMT  
KKGDMIKFLIPYVIREGKSQLVIAIGCTGGKHRSVTIANALYDILLKEDYSVIVNHRDIGEE

>THESCAR\_UPF0042

MEDLRLVITGMSGAGKTVQALRAMELDGYFCVDNLPALIPKFAELCAQSAGRVKIALVVDIRGGEFFDTLVQVLEDMEKQGFYFIEFLAADETIRRYKETRNR  
HPMAPHGRISEGSRERDRLEHIRGRATHIIDSLSLTAQLKDKIAALFAGEREYEMITIVVSFGFKYGIPLDADLVDFVDFRFLPNPYYDPTLRNLTLGLDKEVYDFVMT  
WPTTQGFMEKLGGLVDFLVPNYIKEGKSQLIIVGCTGGHLRHSVFAVKIYEGLRNKGKYNVEHRDIKHNVIEPC

>VIBALG\_V12G01\_14314

MRLIVVSGHSGAGKSVALRVLEDLGYCVDNLPVNLDAFVHVSADSKQNVAVSIDIRNIPKPKELTSTLEQLKTELDVTVLFLDANKETLLKRYSETRRHPLSLGGT  
SLSLDQAIREKQILTPKKAHADLVNSSGQSLHELSETVRMRVEGRDRKGLVMVFEFSGFKYGLPSDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
VLSLKYQIESFIENWLPLEKNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYLTQKIGEYFANKGHQVQIRHTSLEKNAKE

>VIBANG\_VAS14\_19686

MMLMIVSGRSGSGKSVALRVLEDLGYCVDNLPVNLDPQFVKDIAHTEQDIAVSDVNRNMPQQGPEIQRLKSLENDVDVNVVFLDADDKELVKRYSETRRHPLSL  
RQNMITLEQAITSSEAILGDLKEHADLVDTTNSIHLSETVRARVLGREAKELLVFEFSGFKHGLPSDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
VNQLNYQIRNFIESWLPMLKNNRSYLTVAIGCTGGQHRSVYIAQSLADYFEHQGGQVQVRRHRTLEEKQ

>VIBCHO\_VC2532

MRLIVVSGQSGAGKSVALRVLEDLGYCVDNLPVSLTAFIQSVQGSQNVAVSIDIRNIPKPEPSLVQDVLQKQNDVSMFLDASKETLLKRYSETRRHPLSL  
QSKPLSAQIAIELEKQLLPLKEQADLLDSSNQLHELSETVRMRIEGRERKDLVMVFGSFGFKYGLPTDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
EVMELKQIQKFVWLPMLKNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYLTQKIGEYFAQLGHQVQLRHTSLEKQQS

>VIBFIS\_VF0384

MKLMVSGSSGAGKSVALRVLEDLGYCVDNLPIDLLTQFVSIQHSQNVAVSIDIRNIPKDPALLKNTLALLKKTHTDVTIFLDAEDKELIKRYSETRRHPLSLIG  
EQCSLEQAVTLEKSLSDYREEADLVDTTTSIHLSETVRSRILGRESKELVMVFEFSGFKHGLPTDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
VIQLKEQIQFLLTWLPALEKNNRSYLTVAIGCTGGQHRSVYITQKIGEYFQKQVQVQIRHKTLEKNAKE

>VIBHAR\_AAF72890

MRLIVVSGHSGAGKSVALRVLEDLGYCVDNLPVNLDAFVQSVSESKQNVAVSIDIRNIPKPKELNTTLEKLAELDVTVFLDANKETLLTRYSETRRHPLSLSD  
QSLSDQAIREKQILTPKKAHADLVNSSGQSLHELSETVRMRVEGRDRKGLVMVFEFSGFKYGLPSDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
SVLDLKYQIESFIETWLPLEKNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYLTQKIGEFFADKGHQVQIRHTSLEKNAKE

>VIBPAR\_VP2673

MRLIVVSGHSGAGKSVALRVLEDLGYCVDNLPVNLDAFVHSIADSKQNVAVSIDIRNIPKPKELTGTLEQLKTELDVTVLFLDANKETLLKRYSETRRHPLSLGGQ  
SLSLDQAIREKQILTPKKAHADLVNSSGQSLHELSETVRMRVEGRDRKGLVMVFEFSGFKYGLPSDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
LSLKYQIESFIETWLPLEKNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYLTQKIGEYFADKGHQVQIRHTSLEKNAKE

>VIBSPL\_V12B01\_07423

MRLIVVSGQSGAGKSVALRVLEDLGYCVDNLPVNLSDVESVREINQNVAVSIDIRNIPKPEQLVTETLEQLEAATDIDVNVFLDASKQTLKRYSETRRHPLSL  
GQEKLSLEQAIDLEKTLTPLAEQASIVIDSSDCNLYELSEKVRFKVEGKEKQELIVFQSFQFKYGLPSDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
VLELQKQIQGFVEQWLPMLKNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYLTQKIGEYFQELGHQVQIRHASKHQQG

>VIBVUL\_VV0445

MRLIVVSGHSGAGKSVALRVLEDLGYCVDNLPVNLSEFQSVSESKQNVAVSIDIRNIPKPKELTTLTKLQKSSIDLILFLDADKATLLKRYSETRRHPLSLSD  
ECHTLDDAIDLEKMLKPLKEIADILLNSSQSLHDLSEVRYRIEGKERNKLMVFEFSGFKHGLPTDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
ELKRQIQTFIEHWLPLEKNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYLTQKIGEYFAAMGHTVKIRHTLEKNAKE

>YERBER\_ZP\_00821539

MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLANTLAGRNISAAVSDVNRNMPESPEVFEHAMTQLPDSFSPQLFLDADRNTLIRYSOTRRHPLSL  
KNLSLESAIDEESSILLEPLRSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFEFSGFKHGPIDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
NFVYQTRSYLEQWLPMLTNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQADYFRARGKQVSRHRTLEKNAKE

>YERENT\_ZP\_00834134

MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLASTLADRNISAAVSDVNRNMPESPEVFEHAMTQLPDSFSPQLFLDADRNTLIRYSOTRRHPLSL  
KNLSLESAIDEESSILLEPLRSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFEFSGFKHGPIDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
HNFYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQADYFRARGKQVSRHRTLEKNAKE

>YERFRE\_ZP\_00828963

MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLASTLAERNISAAVSDVNRNMPESPEVFEHAMTQLPDSFSPQLFLDADRNTLIRYSOTRRHPLSL  
KNLSLESAIDEESSILLEPLRSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFEFSGFKHGPIDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
NFVYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQADYFRARGKQVSRHRTLEKNAKE

>YERMOL\_ZP\_00827279

MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLASTLADRNISAAVSDVNRNMPESPEVFEHAMTQLPDSFSPQLFLDADRNTLIRYSOTRRHPLSL  
KNLSLESAIDEESSILLEPLRSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFEFSGFKHGPIDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
HNFYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQADYFRARGKQVSRHRTLEKNAKE

>YERPES\_SP

MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLASTLADRNISAAVSDVNRNMPESPEVFEHAMTQLPDSFSPQLFLDADRNTLIRYSOTRRHPLSL  
KNLSLESAIDEESSILLEPLRSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFEFSGFKHGPIDADYVDFVDFRFLPNPHWEPALRPLTGLDAPIAAFLEQHQ  
HNFYQTRSYLELWLPMLTNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQADYFRARGKQVSRHRTLEKNAKE

## Anhang

>YERPSE\_YPTB3529  
MVLMI VSGRSGSGKSVLRAL EMDGFYCV DNL P VLLPQLASTLADRNISA AVSIDVRNMPESPVEVFEHAMTQLPDSFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSA  
KNLSLESAID EESDLLEPLRSRADLIIDTSEMSVHELAEMLRTRLLGKRERELTMVFEFSGFKHGIPIDAVYVDFVRLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVISFLDRHTEV  
HNFIYQTRSYLEQWLPLMLETNRRSYLTVAGCTGGKHSRVYVAEQ LADYFRARGKNVQSRHRTLKRKK

>ZYM MOB\_ZMO1325  
MSRNDLSSAPSSSAAPPARILLVTGLSGAGKSTALRTFEDMGWETVDNLP LSLLELITPPSSVAAYKGRPLALGIDSRTRGFTVDAFLKGV EQLRQHHSQPIDILF  
LDCSDSEL MRRFDTRRRHPLALDRPMEDGISEERAF LAPVREIADFLIDTTTTSSHLSQELSRQQFAPENS VAPNVLSLFGSRGIPRNC DLLFDMRFLQNPYWE  
EALRPLTGLDPEADIYEQDPSFLPAVTKIKDLLLFLPRYIDTGKSYVIAFACTGGRHRSVYVAEWIAARLRQAHFSLTITHRDLKLP LLESQSNRIRAGKAYQGG

### 7.6.2. Clustal W-Analyse

#### CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
LeiXyl_Lxx11490 -----MTSDVETT---AEQQEVLIVT 18
StpAve_SAV6292 MTEHEERQERSAQQQEAHKEGSDQAPQAAQENGAQVSTGIETAGVDPDAVIPELVLS 60
MycTubCDC1551_MT1464 -----MMNHARGVEN--RSEGG-----GIDVVVLVT 23
MycTubH37Rv_RV1421 -----MMNHARGVEN--RSEGG-----GIDVVVLVT 23
MycSme_MSMEG3088 -----MSEMMRNSSSGVSSGGASEKDGVESHEGIDVVVLVT 35
NocFar_nfa358930 -----MTRVESNNTASQAPPAGTLEQQVEVVIVT 31
CorEff_CEL710 -----MNQTPGSTVPEATPVTSPASSPSAPETTFPVIVT 36
BifLon_BL0705 -----MNQTTNRDTGEAAATNAPANASATSTSTPDNQPTPLDAFEVLLIT 45
ActFle_ZP_00133926 -----MELIIS 7
HaeDuc_HD0584 -----MELIIS 7
ActSuc_ -----MELIIS 7
ManSuc_MS1718 -----MRQFMELIIS 11
HaeInf_AAC22801 -----MGLMELIIS 11
PasMul_PM0169 -----MELIIS 7
HaeSom_ZP_00132582 -----MELIIS 7
EscColSp_YhbJ -----MVLMI V 7
ShiFle_YhbJ -----MVLMI V 7
SalEntATCC9150_YhbJ -----MVLMI V 7
SalTyp_YhbJ -----MVLMI V 7
SalEntTy2_T3240 -----MVLMI V 7
KlePne_P17163 -----MVLMI V 7
EntSp_ -----MVLMI V 7
YerEnt_ZP_00834134 -----MVLMI V 7
YerMol_ZP_00827279 -----MVLMI V 7
YerFre_ZP_00828963 -----MVLMI V 7
YerPes_Sp. -----MVLMI V 7
YerPse_YPTB3529 -----MVLMI V 7
YerBer_ -----MVLMI V 7
SerPro_ZP_01538297 -----MVLMI V 7
ErwCar_ECA0285 -----MVLMI V 7
PhorLum_plu4044 -----MVLMI V 7
ProMir_AAC64575 -----MVLMI V 7
SodGlo_SG0196 -----MVLMI V 7
PhoPro_PLU4044 -----MQLMVV 7
VibAng_ -----MMLMVV 7
VibAlg_ -----MRLIVV 7
VibPar_VP2673 -----MRLIVV 7
VibHar_AAF72890 -----MRLIVV 7
VibVul_VV0445 -----MRLIVV 7
VibCho_VC2532 -----MRLIVV 7
VibSpl_V12B01_07423 -----MRLIVV 7
VibPis_VF0384 -----MKLMVV 7
AerHyd_AHA_3920 -----MQLIVV 7
AerSal_ABO88502 -----MQLIVV 7
IdiBal_Os145_05430 -----MQLIVV 7
IdiLoi_IL0393 -----MQLIVV 7
AltBac_ATW7_18740 -----MELIIS 7
PseHal_PSHaa2554 -----MELIIS 7
PseTun_PTD2_17262 -----MQLIIS 7
AlteMac_MADE_14619 -----MKLIIS 7
PseAtl_UPF0042 -----MKLIIS 7
ColPsy_CPS_4546 -----MKLIIS 7
SheBal_UPF0042 -----MKLVIV 7
ShePut_UPF0042 -----MKLVIV 7
SheOne_SO3964 -----MKLVIV 7
SheDef_UPF0042 -----MKLVIV 7
SheFri_UPF0042 -----MKLVIV 7
SheAma_Sama_3091 -----MKLVIV 7
SheLoi_UPF0042 -----MKLVIV 7
SheWoo_UPF0042 -----MKLVIV 7
MarAgu_UPF0042 -----MKLVIV 7
AzoSp_eba3650 -----MQIVLIS 7
NitEur_NE1849 -----MQV IIS 7
AciSp_ACTAD3059 -----MKRILIVT 8
ZymMob_ZMO1325 -----MSRNDLSSAPSSSAAPPARILLVT 24
DesRed_UPF0042 -----MSDEGGVEVSSPRLIVT 19
ThesCar_UPF0042 -----MED-----LRLVIT 10
HalOre_UPF0042 -----MQFLIVT 7
DesbHaf_DSY4845 -----MLSKQVRLIVT 12
MooThe_YP_429136 -----MPETKYPRIVT 13
CarHyd_YP_359144 -----MRFIVT 7
SymThe_STH186 -----MMDVDRSIRLIVT 14
CloAce_CAC0511 -----MRFIVT 7
CloTet_CTC02495 -----MRFIVT 7
CloBei_ZP_00909349 -----MRFIVT 7
CloPer_CPE0354 -----MRFIVT 7
AlkMet_UPF0042 -----MKFVIIT 7
TherEth_UPF0042 -----MRFVIIT 7
TherTen_TTE1834 -----MRFVIIT 7
CloThe_UPF0042 -----MRLIIT 7
CalSac_ZP_00884966 -----MILLETIVT 10
BacThu_ZP_00739740 -----MTENN---DIKMVIIT 13
BacWei_UPF0042 -----MTENN---DIKMVIIT 13
BacAnt_GBAA5384 -----MTENN---DIKMVIIT 13
BacCer_UPF0042 -----MTENN---DIKMVIIT 13
```

Anhang

GeoKau_GK3066	-----MGQNGALQPIQLVVIIT	16
GeoThe_GTNG_3015	-----MGQNGTVQPTQLVVIIT	16
BacCoo_UPF0042	-----MGLEG--NMQQFVIIT	14
BacLic_YvcJ	-----MNANGG-HDIQLVVIIT	15
BacSub_YvcJ	-----MSVSES-HDIQLVVIIT	15
BacCla_ABC3036	-----MN-QS--EVEIVVIIT	12
BacHal_BH3569	-----MNVKE--EIDIVVIIT	13
OceThe_OB2468	-----MNQEQ--ETKLVVIIT	13
LisInn_lin2617	-----MASKQ---LKLVIIT	12
LisWel_lwe2422	-----MASKQ---LKLVIIT	12
LisMon_Sp.	-----MASKQ---LKLVIIT	12
ExisSib_UPF0042	-----MEQNO---PQLVVIIT	12
EntcFae_EF0766	-----MPEN---LQLVVIIT	11
EntcFaec_UPF0042	-----MTDN---LQLVVIIT	11
LacPla_lp_0779	-----MAES---LQLVIIS	11
LacSak_YP_395138	-----MTDT---LNLVVIT	11
LacCas_YP_806200	-----MTES---LDLVIIT	11
LacSal_YP_536062	-----MFMSA---LQLVIVT	12
LacBre_YP_794827	-----MTED---IRLVIIIT	11
PedPen_YP_803988	-----MNER---LQFVVIT	11
StrMut_Smu_1306c	-----MSEKK---IDLVIIT	12
StrPyo_Sp.	-----MSDKH---LNLVIVT	12
StrAga_gbs0576	-----MSDEQ---IKLVIVT	12
StrThe_str0831	-----MKTKI---LNLVVIT	12
StrPne_SP1566	-----MTKKQ---LHLVIVT	12
StrSan_YP_001034791	-----MSEKK---IQLVIVT	12
StrSui_UPF0042	-----MSDK---LHLVIVT	11
LactLac_L188550	-----MENK---LNVIIIT	11
LacReu_ZP_01164767	-----MRKEELVMVDK---LKVVIIT	19
LacAci_LBA0691	-----MADE-K---KQLLIVT	12
LacDel_YP_618706	-----MIEFNVLWEQYIGIMHEKYK---KQLLIVT	26
LacGas_YP_815115	-----MAEQ-K---KQLLIVT	12
LacJoh_LJ0866	-----MAEQ-K---KQLLIVT	12
StaAur_Sp.	-----MDNN-EKEKSKSELLVIT	17
StaEpi_SE0548	-----MTSN-EKEMGSKSELLVIT	17
StaHae_SH2124	-----MTNHKENEMSKSELLVIT	18
StaSap_SSP1952	-----MQPD-EKEIVKSELLVIT	17
FusNuc_FNL089	-----MKTKHIIIVT	10
GloVio_glr4163	-----MTSFSAPGSPVDTVLIT	17
TheThe_TTHA0319	-----MRFLVIT	7
	:::	
LeiXyl_Lcx11490	GMSGAGRSTVANALEDLDWYVVDNLPQMLRPLIELANRA---ES--GLPRIAAVVDVR	72
StpAve_SAV6292	GMSGAGRSTAAKCLELDGWVVDNLPALIPMTVELGAR---QG--NVARIAVVVDVR	114
MycTubCDC1551_MT1464	GLSGAGRGTAAKVLEDLGWYVADNLPPLITRMVDFGLAA---GS--RITQLAVMDVR	77
MycTubH37Rv_RV1421	GLSGAGRGTAAKVLEDLGWYVADNLPPLITRMVDFGLAA---GS--RITQLAVMDVR	77
MycSme_MSMEG3088	GLSGAGRGTAAKVLEDLGWYVADNLPPELLIARMVDLGLAA---GS--RITQLAVMDVR	89
NocFar_nfa358930	GLSGAGRGTAAKVLEDLGWYVADNLPPELLIGRMVELGAAA---DP--PIRRLALVMDVR	85
CorrEff_CB1710	GMSGAGLSTAAKRVLEDLGWVVDNLPQMLPLVMECARE---DS--PVDKVAVVCDVR	90
BifLon_BL0705	GMSGAGRSHAADCVEDMGWYVVDNLPKLLIPLVDMMTTSGSGSES--GVHKLAAVVDVR	103
ActPle_ZP_00133926	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPPLIPELAGFLSNQGRS-----AVVSLDIR	58
HaeDuc_HD0584	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPPLIAELASFLASDCS-----AVVSLDIR	58
ActSuc_	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPIDLLPQLADILSQSQAS-----AAISLDIR	58
ManSuc_MS1718	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPINLLPELADILSTSQQS-----AAVSLDIR	62
HaeInf_AAC22801	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPIDLLPQLDILSQSQSS-----VAISLDIR	62
PasMul_PM0169	GHSGAGKSVLRCLEDVGYCVDNLPIDLLPQLASILSTNQQS-----VAISLDIR	58
HaeSom_ZP_00132582	GRSGAGKSVLRALEDVGYCVDNLPIDLLPQLVDMLENKQHL-----VAISLDIR	58
EscColSp_YhbJ	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPDLARTLADREIS-----AAVSDIVR	58
ShiPle_YhbJ	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPDLARTLADREIS-----AAVSDIVR	58
SalEntATCC9150_YhbJ	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPDLARTLADREIS-----AAVSDIVR	58
SalTyp_YhbJ	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPDLARTLADREIS-----AAVSDIVR	58
SalEntTy2_T3240	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPDLARTLADREIS-----AAVSDIVR	58
KlePne_P17163	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPELARSADRNIS-----AAVSDIVR	58
EntSp_	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPELARTLADREIS-----AAVSDIVR	58
YerEnt_ZP_00834134	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLASTLADRNIS-----AAVSDIVR	58
YerMol_ZP_00827279	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLASTLADRNIS-----AAVSDIVR	58
YerFre_ZP_00828963	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLASTLADRNIS-----AAVSDIVR	58
YerPes_Sp.	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLASTLADRNIS-----AAVSDIVR	58
YerPse_YPTB3529	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLASTLADRNIS-----AAVSDIVR	58
YerBer_	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLANTLAGRNIS-----AAVSDIVR	58
SerPro_ZP_01538297	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLANTLAGRNIS-----AAVSDIVR	58
ErwCar_ECA0285	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPELANTLAGRNIS-----AAVSDIVR	58
PhoLum_plu4044	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPELANTLADRDIS-----AAVSDIVR	58
ProMir_AAC64575	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPELAKTLAERDAA---A---AAVSDIVR	59
SodGlo_SG0196	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLASALANIS-----AAVSDIVR	58
PhoPro_PLU4044	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQFISTVENNEQD-----IAVSDIVR	58
VibAng_	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQFVKDIATHEQD-----IAVSDIVR	58
VibAlg_	GHSGAGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLDAFVHVSADSKQN-----VAVSDIVR	58
VibPar_VP2673	GHSGAGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLDAFVHVSADSKQN-----VAVSDIVR	58
VibHar_AAF72890	GHSGAGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLDAFVQSVESKQN-----VAVSDIVR	58
VibVul_VV0445	GHSGAGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLSFTQSVESKQN-----VAVSDIVR	58
VibCho_VC2532	QSGGAGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLTAFTQSVQGSQQN-----VAVSDIVR	58
VibSpl_V12B01_07423	QSGGAGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLSDFVESVREINQN-----VAVSDIVR	58
VibRis_VF0384	GSSGAGKSVLRALEDVGYCVDNLPIDLLTQFVESIQHSSQN-----VAVSDIVR	58
AerHyd_AHA_3920	GRSGSGKTVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
AerSal_ABO88502	GRSGSGKTVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
IdiBal_OS145_05430	GRSGSGKTVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
IdiLoi_IL0393	GRSGSGKTVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
AltBac_ATW7_18740	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
PseHal_PSHaa2554	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
PseTun_PTD2_17262	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
AlteMac_MADE_14619	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
PseAt1_UPF0042	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
ColPsy_CPS_4546	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
SheBal_UPF0042	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
ShePut_UPF0042	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
SheOne_SO3964	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
SheDef_UPF0042	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
SheFri_UPF0042	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
SheAma_Sama_3091	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
SheLoi_UPF0042	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
SheWoo_UPF0042	GRSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	58
MarAq_UFP0042	GRSGSGKSTALHVLLEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	63
AzoSp_eba3650	GLSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	59
NitEur_NE1849	GLSGSGKSVLRALEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	59
AcisP_ACIAD3059	QSGSGKSSALQVLEDVGYCVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	61
ZymMob_ZMO1325	GLSGAGKSTALRTFEDMGWETVDNLPVLLPQLIVSVESQYDK-----LAVSDIVR	80

# Anhang

DesRed_UPF0042	GMSGAGKTQAVQSLLEDLGYFCVDNLPALIPKFAELVSQSN-----GKVEKVALVVDIR	73
ThesCar_UPF0042	GMSGAGKQSVARAMELGYFCVDNLPALIPKFAELCAQSA-----GRVRIKIALVVDIR	64
HalOre_UPF0042	GMSGAGKSVALNFFEDMGFFCIDNLPALIPKFAELCLHS-----ELDKIAVVDIR	59
DesBhaf_DS54845	GLSGAGKTALQSLLEDQGYFCVDNLPSSLIPKFAELCTQS--Q---GK-VTRAIVCDLR	66
MoOThe_YP_429136	GLSGAGKTQAVRCLLEDLGYFCVDNLPSSLIPKFAELVGHQKE---GEGITKVALVMDIR	70
CarHyd_YP_359144	GLSGAGKTQAMRALEDLGYFCVDNLPSSLIPKFAELVAHA---E---NK-IEKVALVVDIR	61
SymThe_STH186	GMSGAGKTQALKYLEDLGYFCVDNLPSSLIPKFAELVGGQT--E---GK-VSRHALGDIR	68
CloAce_CAC0511	GLSGAGKTQAIRSLEDLGYFCVDNLPALIPKFAEQVCYSES-----KINKIALVIDIR	61
CloTet_CTC02495	GLSGAGKTQAIRSLEDLGYFCVDNLPSSLIPKFAEACYKTDG-----RINKIALVIDIR	61
CloBei_ZP_00909349	GLSGAGKTQARTLEDLGYFCVDNLPSSLIPKFAEVCQSGG-----NIEKVALVIDIR	61
CloPer_CPE0354	GLSGAGKTATRSLEDLGYFCVDNLPSSLIPKFAEACVQSEG-----KIDKIALVIDIR	61
AlkMet_UPF0042	GLSGAGKQSQTKSMEDGFYFCVDNLPALIPKFAELCHQSQG-----VISRAALVIDIR	61
TherEth_UPF0042	GLSGAGKTQALKAMEDMGFFCIDNFPALPKLADLFFYHSK-----NVDKVALGMDLR	60
TherTen_TTE1834	GLSGAGKTQALKAMEDMGFFCIDNFPALPKLADLFFYHSK-----NIDKVALGMDLR	60
CloThe_UPF0042	GLSGAGKSLVVKYLLEDLGYFCVDNLPSSLLPKFAELIKLSRG-----KISKVALVIDIR	61
CalSac_ZP_00884966	GMSGAGKSLAIRAFEDMGFFCIDNLPQFLPKIAELASASND-----KISRIAAVIDIR	64
BacThu_ZP_00739740	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELMADSKGK-----MNKVALGIDLR	67
BacWei_UPF0042	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELMADSKGK-----MNKVALGIDLR	67
BacAnt_GBAA5384	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELMADSKGK-----MNKVALGIDLR	67
BacCer_UPF0042	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELMADSKGK-----MNKVALGIDLR	67
GeoKau_GK3066	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----MNKVALVMDLR	70
GeoThe_GTNG_3015	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----MNKVALVMDLR	70
BacCoa_UPF0042	GMSGAGKTVALQSLLEDLGYFCVDNLPMLPKFELMKDANSK-----MNKVALVMDLR	68
BacLic_YvcJ	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELMKESSK-----MSKVALVMDLR	69
BacSub_YvcJ	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELMKESSK-----MSKVALVMDLR	69
BacCla_ABC3036	GMSGAGKSVAVRSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKGIDK-----VTKVALVMDLR	66
BacHal_BH3569	GMSGAGKTVALQSLLEDLGYFCVDNLPALIPKFAELIETSSSGK-----MNKLALVIDLR	67
OceThe_OB2468	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELMADATNN-----IQKVALVMDLR	67
LisInn_lin2617	GMSGAGKTVALQSLLEDLGYFCVDNLPMLPKFELMKES-DK-----MDKIALVMDLR	65
LisWel_lwe2422	GMSGAGKTVALQSLLEDLGYFCVDNLPMLPKFELMKES-DK-----MDKIALVMDLR	65
LisMon_Sp.	GMSGAGKTVALQSLLEDLGYFCVDNLPMLPKFELMKES-DK-----MDKIALVMDLR	65
ExiSib_UPF0042	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVIGQV-----RPKIAVAIDTR	63
EntcFae_EF0766	GMSGAGKTVALQSFEDMGYFCVDNLPMLPKFELVIGQV-----VTKIALVIDLR	64
EntcFae_UPF0042	GMSGAGKTVALQSFEDMGYFCVDNLPMLPKFELVIGQV-----VTKIALVIDLR	64
LacFla_lp_0779	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFSELVSESNGK-----IKKVALVIDLR	64
LacSak_YP_395138	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----VTKIALVIDLR	64
LacCas_YP_806200	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
LacSal_YP_536062	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
LacBre_YP_794827	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
PedPen_YP_803988	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
StrMut_Smu_1306c	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
StrPyo_Sp.	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
StrAga_gbs0576	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
StrThe_str0831	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
StrPne_Sp1566	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
StrSan_YP_001034791	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
StrSui_UPF0042	GMSGAGKTVALQSFEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
LactLac_L188550	GMSGAGKTVALQSFEDMGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
LacReu_ZP_01164767	GMSGAGKTVALQSLLEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
LacAci_LBA0691	GMSGAGKTVALQSLLEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
LacDel_YP_618706	GMSGAGKTVALQSLLEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
LacGAS_YP_815115	GMSGAGKTVALQSLLEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
LacJoh_LJ0866	GMSGAGKTVALQSLLEDLGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	64
StaAur_Sp.	GMSGAGKSLVQSLLEDMGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	65
StaEpi_SE0548	GMSGAGKSLVQSLLEDMGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	65
StaHae_SH2124	GMSGAGKSLVQSLLEDMGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	65
StaSap_SSP1952	GMSGAGKSLVQSLLEDMGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	65
FusNuc_FN1089	GLSGAGKTVALQSLLEDMGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	65
GloVio_glr4163	GLSGAGKSLVQSLLEDMGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	65
TheThe_TTHA0319	GLSGAGKTVALQSLLEDMGYFCVDNLPMLPKFELVKSNGK-----ITKIALVIDLR	65
.	.*:.* .** .: .: . :	:
LeiXyl_Lxx11490	GRN-FFADLQEMIQLR----EGTKVRVLFLEADVTLVRRFQVRRPHPLQGN---GT	123
StpAve_SAV6292	GRR-FFDNLRESLADLES----KNVTRRVLFLESDVALVRRFESVRRPHPLQGN---GR	166
MycTubCDC1551_MT1464	SRG-FTGDLDVVRNELAT----RAITPRVVFMEASDDTLVRRYEQNRSHPLQGE---QT	129
MycTubH37Rv_RV1421	SRG-FTGDLDVVRNELAT----RAITPRVVFMEASDDTLVRRYEQNRSHPLQGE---QT	129
MycSme_MSMEG3088	SKG-FTGDLDVVRNELAT----RNIAPRVVFMEASDDTLVRRYEQNRSHPLQGT---QT	141
NocFar_nfa358930	SRR-FTGDLVAVDLRA----LGLRTRVLFLEASDDTLVRRYEQNRRSHPLQESADGT	140
CorEff_CEL710	SRE-FRGGRLREITILEE----KNLAPTFLVFDARDDLEIRRFVNRVTHPLQGS---QT	142
BifLon_BL0705	S-S-YFDELAAVGHLD---LGVKTRVLFLEASDVNLIKRYESVRRPHPLQGN---NR	154
ActPle_ZP_00133926	NIPENPESIEALLQSLK----TIQTIRIFLDCEARTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	112
HaeDuc_HD0584	NFPENLTRIDELHQLSQL---TINTKMIFLDCEASATLIRRYSDTRRLHPLSNQ---DLS	112
ActSuc_	NLPNSQHLDELITLEN----KHOIKIFLADRSTLIRRYSDTRRLHPLSNQ---DLS	113
ManSuc_MS1718	NLPNSPETLDTLQQQLADA---QHQVRIIFLEADRSTLIRRYSDTRRLHPLSNQ---DLS	116
HaeInf_AAC22801	NIPNSAHLKQTLSTLK----HQKIEIFLEADRSTLIRRYSDTRRLHPLSLK---DLS	115
PasMul_PM0169	NLPHSSKTIENLITVQ---QHQKIFLADRSTLIRRYSDTRRLHPLSTQ---DLS	111
HaeSom_ZP_00132582	NLPQPEITLDTLILQLQ---KYVPKIIIFLDRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
EscColSp_YhbJ	NMPESPEIFEQAMNLDP----AFSPQLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
ShiFla_YhbJ	NMPESPEIFEQAMNLDP----AFSPQLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
SalEntATCC9150_YhbJ	NMPESPEIFEQAMNLDP----AFSPQLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
SalTyp_YhbJ	NMPESPEIFEQAMNLDP----AFSPQLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
SalEntTy2_T3240	NIPESPEIFEQAMNLDP----AFSPQLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
KlePne_P17163	NMPESPEIFEQAMNLDP----AFSPQLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
EntSp_	NMPESPEVFQAMSSLEPE---TFSPQLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
YerEnt_ZP_00834134	NMPESPEVFHAMTQLPD----SFSPLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
YerMol_ZP_00827279	NMPESPEVFHAMTQLPD----SFSPLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
YerFre_ZP_00828963	NMPESPEVFHAMTQLPD----SFSPLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
YerPes_Sp.	NMPESPEVFHAMTQLPD----SFSPLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
YerPse_YPTB3529	NMPESPEVFHAMTQLPD----SFSPLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
YerBer_	NMPESPEVFHAMTQLPD----SFSPLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
SerPro_ZP_01538297	NMPESPEVFHAMTQLPD----SFSPLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
ErwCar_ECA0285	NMPESPEIFEHAMEQLPP----SFSPLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
PhoTlum_plu4044	NMPESPEVFHEALTKLPA---SFSPLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
ProMir_AAC64575	NMPESPEIFEHAMEQLPP----SFSPLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	112
SodGlo_SG0196	NMPESPEIFEQAMNLDP----AFAPQLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSNK---DLS	111
PhoPro_PLU4044	NMPESPVGVIQTLNLSDDK---DINVIPIFADDDKELVRYSETRRHPLSK---HDM	111
VibAng_	NMPQPPGEIQLRILKLENDV---DVNVVFLDADDKELVRYSETRRHPLSK---QNM	111
VibAlg_	NIPKKLKLTLSTLEQLKTEL---DVTVFLDANKETLLKRYSETRRHPLSLGGTSL	113
VibPar_VP2673	NIPKKLKLTLSTLEQLKTEL---DVTVFLDANKETLLKRYSETRRHPLSLGGTSL	113
VibHar_AAF72890	NIPKKLKLTLSTLEQLKTEL---DVTVFLDANKETLLKRYSETRRHPLSLGGTSL	113
VibVul_VV0445	NIPKKLKLTLSTLEQLKTEL---DVTVFLDANKETLLKRYSETRRHPLSLGGTSL	113
VibCho_VC2532	NIPKKLKLTLSTLEQLKTEL---DVTVFLDANKETLLKRYSETRRHPLSLGGTSL	113
VibSp_V12B01_07423	NIPKKLKLTLSTLEQLKTEL---DVTVFLDANKETLLKRYSETRRHPLSLGGTSL	113
VibPis_VP0384	NIPKKLKLTLSTLEQLKTEL---DVTVFLDANKETLLKRYSETRRHPLSLGGTSL	113
AerHyd_AHA_3920	NLPASDPLETLLAQVRNEG---RVFSSFFDADENSTLLKRYGSRRLHPLSRN---QL	113
AerSal_ABO88502	NLPVSAKLETLLAQVRNEG---RVFSSFFDADENSTLLKRYGSRRLHPLSRN---QL	113
IdiBal_OS145_05430	NLPEDSQELLESIDFLPAE---VDIEVFLFIDDADDQTLQRFGETRRHPLSQ---QLP	111

Anhang

IdiLoi\_I10393 NLPKPEHSEELLDLSFLPKG----VEPEILFDSDNTLLKRFGETRRLHPLSQK--ELP 111  
AltBac\_ATW7\_18740 NLPKPEQDEFNHIIYLPGF----TKPTLFYLDSEDQTLIKRFSETRRLHPLSID--SLP 111  
PseHal\_PSHAa2554 NLPKPDQQQFNDILBYLPDF----AKPTLFYLDSDDTLIRRYSETRRLHPLSID--SLP 111  
PseTun\_PFD2\_17262 NLPKIQQEFNIEYLPPEF----AKPTLFYLDSDNTLIRRFSETRRLHPLSID--SOP 111  
AltMac\_MADE\_14619 NLPKPNDDLVLELDYLPSS----WSMTIVYIDASDDVVKRFSETRRLHPLAKL--NKS 111  
PseAt1\_UPF0042 NLPKDPNLSVLELDYLPST----WEMTLYLDASDDVVKRFSETRRLHPLSKQ--NKS 111  
ColPsy\_CPS\_4546 NLPKDPEDIPETIAYLPKA----VDVNTFLDADDNDRRFSETRRLHPLIKE--NMA 111  
SheHal\_UPF0042 NMPKQDKVLVQLASLPDD----TEITSFFLNSSDKILLKRYSETRRLHPLSKS--QVS 111  
ShePut\_UPF0042 NMPKQDKVLVQQLSNLPAG----TEITSFFLNSSDKVLLKRYSETRRLHPLSKS--RVS 111  
SheOne\_S03964 NLPKQDKVLVQLASLPPE----TEITSFFLNSSDKVLLKRYSETRRLHPLSKS--QVS 111  
SheDef\_UPF0042 NIAEQGKVLVQQLALLPPE----TEISSFFLNSSDKVLLKRFSETRRLHPLSKS--RMS 111  
SheFri\_UPF0042 NIAEQGKVLVQQLALLEND----TEISSFFLNSSDKVLLKRYSETRRLHPLSKN--HIS 111  
SheAma\_Sama\_3091 NMPKQKALEKELARLPEG----VELTSFFLNSSDKVLLKRYSETRRLHPLSKS--KVS 111  
SheLoi\_UPF0042 NMPSEIQLEKQAKLAKPD----TEILSFFLNSSDKVLLKRYSETRRLHPLSKS--KVS 111  
SheWoo\_UPF0042 NMH--ETELDKQLSNLPEG----TEILSFFLNSSDKVLLKRYSETRRLHPLSKS--KTS 109  
MarAgu\_UPF0042 NLSAELANFETIYQQLKQT---GVLEIIFLDADQESLLQRFHATRRKHPLSD--KTS 117  
AzoSp\_eba3650 SGA-SLLALPQQVEHLHAL---ASDLRILFDARDTLLIARFSETRRRHPLASE--DVS 112  
NitBur\_N81849 SGE-NITVUR\_N81849---SIQIKFIFLEARTETLMQRFSETRRRHPLSDK--NIT 111  
AciSp\_ACTAD3059 STRADMQEFDLVFEQLQKH---GTVDVITLTDQDELIAARFSASRRPHPLASR--FKS 114  
ZymMob\_ZMO1325 TRGFVTADFLKGVQLRQHH---SQPIDLFLDCSDDELMRRFDTTRRHPLALD--RP 134  
DesRed\_UPF0042 GGA-FHQAIIVLHDLGE---QGYRFVFLFEASDETLVRRYKESRRRHPLDN-H-G-E 125  
BacCar\_UPF0042 GGE-FDFTLVQVLEDMEK---QGFYIILFEAADETILIRRYKETRRRHPLAP-H-G-R 116  
HalOre\_UPF0042 GRE-FFNALFSELSSELEK---RGIDYIILFEASDEVILIRRYKETRRRHPLDE-E-G-R 111  
DesbHaf\_DSY4845 GGE-FFSSLAELGDLHR---EGFHYIILFEASDEVILVGRYKESRRRHPLSP-S-G-G 118  
MooThe\_YP\_429136 GGE-FFSGDLAALNYLDG---LGIPIYIILFEAADEVILVRRYKETRRRHPLSS-G-G-Q 122  
CarHyd\_YP\_359144 GQK-FFQDLDWALGELTK---LGIKYIILFEARDEVILKRFKANRRGHPLGV-R-GSQ 114  
SymThe\_STH186 GGR-FFHEILGALRQIAE---IGVAYQLFMDASDEVILVRRYKETRRRHPLAA-Q-G-R 120  
CloAce\_CAC0511 GGE-FFDNLFESELYLKE---AGYKYIILFLDADNEVLKRFKESRRKHPLAP--NGR 113  
CloTet\_CTC02495 GGE-FFDNLFESELYLKD---QNYKYIILFEASDEVILKRFKETRRRHPLSP--GGR 113  
CloBei\_ZP\_00909349 GGI-FFDDFFAELNYLKK---NEFKYIILFEATDEVILKRFKETRRSHPLSP--DGR 113  
CloPer\_CPE0354 GGI-FFDDLFESIEYLKA---NDFNYIILFEASDEVILKRFKETRRSHPLSP--DGR 113  
AlkMet\_UPF0042 GGM-FFDDLFESLKELEH---LGHQYIILFLDADDEVLMKRFKETRRSHPLNV--DGS 113  
TheEth\_UPF0042 GGG-FFEDIYSSEFLK---NNYDYIIVFEASDEVILKRFKETRRKHPLSE--EGR 112  
TheTen\_TTE1834 GGG-FFEDIYSSEFLK---NNYDYIIVFEASDEVILKRFKETRRKHPLSE--EGR 112  
CloThe\_UPF0042 GGE-LFNDLVPLELNAKKE---SGIDYIILFEASDQVILKRYKESRRRHPLAP--EGR 113  
CalSac\_ZP\_00884966 GGE-LFDDPKDVLNLDK---GTYNFKVFLDADHNDVLRQRYKETRRKHPLSPES-DGS 118  
BacThu\_ZP\_00739740 GRE-FFEHLWALDDELE---RTWIIPHILFLDADKSTLVTRYKETRRSHPLAT--GL 120  
BacWei\_UPF0042 GRE-FFEHLWALDDELE---RTWIIPHILFLDADKSTLVTRYKETRRSHPLAT--GL 120  
BacAnt\_GBAA5384 GRE-FFEHLWALDDELE---RTWIIPHILFLDADKSTLVTRYKETRRSHPLAT--GL 120  
BacCer\_UPF0042 GRE-FFEHLWALDDELE---RTWIIPHILFLDADKSTLVTRYKETRRSHPLAT--GL 120  
GeoKau\_GK3066 SRD-FFDHLFAALDELAEE---QAVVIPQVFLDADQSTLVVARYKETRRTHPLAPN--BP 123  
GeoThe\_GTNG\_3015 SRD-FFDHLFVALDELAEE---QEWIVPQVFLDADQSTLVVARYKETRRTHPLAPN--BP 123  
BacCoo\_UPF0042 GRE-FFDLDLFRALDELK---SSWVTPILFLDADDSVLRVRYKETRRSHPLSP--DGT 121  
BacLic\_YvcJ GRE-FFDLSLEALDEIGE---TSWITPRILFLDADKSVLVRVRYKETRRSHPLAT--GL 122  
BacSub\_YvcJ GRE-FFDRLIEALDEMAE---NPWITPRILFLDADKSVLVRVRYKETRRSHPLAT--GL 122  
BacCla\_ABC3036 GQS-FFDELFAKIDELNET---PASRLKIQILFLDADKSKLVQRYKETRRTHPLAK--GL 121  
BacHal\_BH3569 GQT-FFDQFLFESIDLQDS---SLSKYNIQILFLDADKAKLVQRYKETRRSHPLAKH--GL 122  
OceIhe\_OB2468 GRE-FFDLSLEALDVLAK---ENWLEDHILFLDADKALVTRYKETRRSHPLATD--GL 120  
LisTnn\_lin2617 GRE-FFDLSLEALDELND---TNFITTKILFEADDKVLVRSRYKETRRHHPLFN--GS 118  
LisWel\_lwe2422 GRE-FFDLSLEALDELND---TNFITTKILFEADDKVLVRSRYKETRRHHPLFN--GS 118  
LisMon\_Sp GRE-FFDLSLEALDELND---TNFITTKILFEADDKVLVRSRYKETRRHHPLFN--GS 118  
Exisib\_UFF0042 ARD-FIDSFFVIVDELK---TNLQIRMLYLDARNVLRVRYKESRRSHPLAT--AS 115  
EntcFae\_EF0766 SRT-FFREIQDMLVELEN---TNFIDTILFLDADDEELVRSRYKETRRAHPLAMD--GL 117  
EntcFae\_UFF0042 SRS-FFREIQNMLIEEN---TNFIDTILFLDADDEELVRSRYKETRRAHPLAMD--GL 117  
LacPla\_lp\_0779 SRA-FYDEIMDMLANLND---TDFVTRILFLDASNEELVRSRYKETRRSHPLAME--GR 117  
LacSak\_YP\_395138 SRA-FYDGIEMLSGLDN---TQFVTTKILFLDASDEELVRSRYKETRRSHPLARN--GR 117  
LacCas\_YP\_806200 SRA-FYDQIIDLMLANLND---NAYVHSRILFLDADDEELVRSRYKETRRSHPLAME--GR 117  
LacSal\_YP\_536062 SRA-FYDEIVEMVRELDE---NEFNSSRILFLDASDEELVRSRYKETRRSHPLAME--GR 117  
LacBre\_YP\_794827 SRA-FYDEIVRMLNDVAV---HGTMAQVFLDASDAELVRSRYKETRRSHPLARN--GR 118  
PedPen\_YP\_803988 SRG-FYDQILGLTGEE---QHNITDVFVLDADDEELVRSRYKETRRSHPLAMD--GR 117  
StrMut\_Smu\_1306c SRL-FFKEVSSILDKIDL---NETINFRILFLDADDEELVRSRYKETRRSHPLAT--GR 118  
StrPyo\_Sp SRL-FFKEINSTLDSIES---NPSIDFWILFLDADDEELVRSRYKETRRSHPLAAD--GR 118  
StrAga\_gbs0576 SRL-FFREINSILDSLEI---NDNINFKILFLDADDEELVRSRYKETRRSHPLAAD--GR 118  
StrInd\_IldQLES---NEKLNFKILFLDADDEELVRSRYKETRRSHPLAAD--GR 118  
StrPne\_SPL566 SRS-FFSEIQAVLDELEN---QDGLDFKILFLDADKELVARYKETRRSHPLAAD--GR 118  
StrSan\_YP\_001034791 SRS-FFSQIQVNLDELEQ---NENIDFKILFLDADKELVARYKETRRSHPLAAD--GR 118  
StrSui\_UPF0042 SRS-FFSEIREVLEDEG---AEDLDFKILFLDADDEELVARYKETRRSHPLAAD--GR 117  
LactLac\_L188550 SRA-FFEDIQIVTELD---NGSVNFKILFLDANDTELVRSRYKETRRSHPLAID--GR 118  
LactReu\_ZP\_01164767 SRG-FYDEVLPNFKLKK---RADLVKILFLDANDVTLISRYKETRRSHPLSPQ--GR 125  
LactAci\_LBA0691 VKA-FYTDLDEVNSLED---NGNVQATILYLDASDDVLRVARYKETRRPLPLANN--GR 120  
LactDel\_YP\_618706 VKS-FYKDLIDEINSLED---SQQTQATIVFEASDDTLVARYKETRRPLPLAEN--GR 132  
LactGas\_YP\_815115 VKS-FYKDLVDEIKSLED---SQNVQSTVFLDASDDVLRVARYKETRRPLPLAHT--GR 118  
LactJoh\_L0866 VKS-FYKDLVDEIKSLED---SQNVQSTVFLDASDDVLRVARYKETRRPLPLAHT--GR 118  
StaAur\_Sp GKE-LFNLSLVAVDVKKS---ESDVIIDVMPLEASTEKLISRYKETRRRHPLMQG--KRS 126  
StaEpi\_S80548 GKE-LFKSLVKEIDIKS---RNDVILDVMPLEAKTEKLISRYKESRRRHPLNEQO--KRS 126  
StaHae\_SH2124 GKE-LFKSLVBEIDAIS---RNDVIVDVMFLEAETEKLISRYKESRRRHPLNENG--QMS 127  
StaSap\_SSP1952 GKE-LFKSLIHEMDLKS---NSDVIVDMMFLEASNERLISRYKETRRRHPLNGNG--KRS 126  
FusNuc\_FN1089 TFK-NTKDPFFTFINYIKE---SGVKMDIIFTEAHEAAILGRYTLRRRHPLKRV---T 109  
GloVio\_glr4163 AQA-GLIAARVALRSLARTT---VHVHLDCEGVLRSYALTRRHPPHWFHD--KG 122  
TheThe\_TTHA0319 ALA-FFQDLLEVLEALRPT-----VVYLEARPEVLLRRYNYLRRVHP-LGAG--N- 105  
..: ..: \* : \*\* \*



Anhang

YerPes\_Sp. LESAIDEESDLLEPLRSRADLIIDTSEMSVHELAEMLRTRLL-GK---RERELTMVFESF 167  
YerPse\_YPTB3529 LESAIDEESDLLEPLRSRADLIIDTSEMSVHELAEMLRTRLL-GK---RERELTMVFESF 167  
YerBer\_ LESAIDEESDLLEPLRSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRLL-GK---RERELTMVFESF 167  
SerPro\_ZP\_01538297 LESAIDEESDLLEPLRSRADLIIDTSEMSVHELAEMLRTRLL-GK---RERELTMVFESF 167  
ErwCar\_ECA0285 LESAIDEESDLLEPLRSRADLIIDTSEMSVHELAEMLRTRLL-GK---RERELTMVFESF 167  
PhorLum\_plu4044 LESAIQESDLLEPLRSRADLIIDTSEMSVHELAEMLRTRLL-GK---RERELTMVFESF 167  
PromIr\_AAC64575 LEMAIQESDLLEPLRSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRLL-GK---RERELTMVFESF 168  
SodGlo\_SG0196 LESAIDEESDLLEPLRSRADLVIDTSEMSVHELAEMLRTRML-GK---RERELTMVFESF 167  
PhoPro\_PLU4044 LEQAIQESAIIVADIKHADLVIDTNTKSIHDLSETVRARVL-GR---ESRKLILVVFESF 167  
VibAng\_ LEQAITSESAILGDLKHADLVIDTNTKSIHDLSETVRARVL-GR---EAKELILVVFESF 167  
VibAlg\_ LDQAIERREKQILTLPLKAHADLVLNSSGQSLHLELSETVRMRVE-GR---DRKGLVMVFESF 169  
VibPar\_VP2673 LDQAIERREKQILTLPLKAHADLVLNSSGQSLHLELSETVRMRVE-GR---DRKGLVMVFESF 169  
VibHar\_AAF72890 LDQAIERREKQILTLPLKAHADLVLNSSGQSLHLELSETVRMRVE-GR---ERKDLVMVFESF 169  
VibVul\_VV0445 LDQAIERREKQILTLPLKAHADLVLNSSGQSLHLELSETVRMRVE-GR---ERKDLVMVFESF 169  
VibCho\_VC2532 LAQAIERREKQILTLPLKAHADLVLNSSGQSLHLELSETVRMRVE-GR---ERKDLVMVFESF 169  
VibSpl\_VL2B01\_07423 LEQAIERREKQILTLPLKAHADLVLNSSGQSLHLELSETVRMRVE-GR---ERKDLVMVFESF 171  
VibFis\_VF0384 LEQAVTLEKSIILSDYREADLVLDITNTKSIHDLSETLRSRIL-GR---ESKELVMVFESF 169  
AerHyd\_AHA\_3920 LDEAIERREKQILTLPLKAHADLVLNSSGQSLHLELSETVRMRVE-GR---KENELVLFVFESF 169  
AerSal\_ABO88502 LDEAIERREKQILTLPLKAHADLVLNSSGQSLHLELSETVRMRVE-GR---KENELVLFVFESF 169  
IdiBal\_OB145\_05430 LLEALQLENRLDPIAVRATWRIDSSHLSHLQSEVSRARVL-GK---ASKQVIVVFESF 167  
IdiLoi\_IL0393 LLEALQLENRLDPIAVRATWRIDSSHLSHLQSEVSRARVL-GK---ADKLIIVVFESF 167  
AltBac\_ATW7\_18740 LDLAIKKELKLLDVLVTRADYVIDTSELVSHQLAESIRKIL-GK---KDKQLIVVFESF 167  
PseHal\_PSHA2554 LDLAIKKELKLLDVLVTRADYVIDTSELVSHQLAESIRKIL-GK---KDKQLIVVFESF 167  
PseTun\_PFD2\_17262 LDAAIKKEKILLDVLVSRADIIIDTSDLVSHQLAEAIRARVL-GK---KDNQLIIVVFESF 167  
AlteMac\_MADE\_14619 LSEAIRAESALLAPIAERADLYLDTDKLTIHQLAELIRERIL-GK---KSSRLVLFVFESF 167  
PseAtl\_UPF0042 LSGAIQAESQLLAPIAERADLYLDTDKLTIHQLAELIRERIL-GK---KSSRLVLFVFESF 167  
ColPsy\_CPS\_4546 LDQAIERREKQILTLPLKAHADLVLNSSGQSLHLELSETVRMRVE-GR---KGSMLVVFESF 167  
SheBal\_UPF0042 LQEAIKLEKLLPEMKSILVDHYIDTSLNLIYELSDQVQIIL-GS---VDKELVINVFESF 167  
ShePut\_UPF0042 LQEAIKLEKLLPEMKSILVDHYIDTSLNLIYELSDQVQIIL-GS---VDKELVINVFESF 167  
SheOne\_S03964 LQEAIKLEKLLPEMKSILVDHYIDTSLNLIYELSDQVQIIL-GS---VDKELVINVFESF 167  
SheDef\_UPF0042 LQEAIKLEKLLPEMKSILVDHYIDTSLNLIYELSDQVQIIL-GS---VDKELVINVFESF 167  
SheFri\_UPF0042 LQEAIKLEKLLPEMKSILVDHYIDTSLNLIYELSDQVQIIL-GS---VDKELVINVFESF 167  
SheAma\_Sama\_3091 LQEAIKLEKLLPEMKSILVDHYIDTSLNLIYELSDQVQIIL-GS---VDKELVINVFESF 167  
SheLoi\_UPF0042 LKRAIQLEKLLDPIAKLVLDHYIDTSLNLIYELSDQVQIIL-GT---VDKELVINVFESF 167  
SheWoo\_UPF0042 LKRAIQLEKLLDPIAKLVLDHYIDTSLNLIYELSDQVQIIL-GT---VDKELVINVFESF 167  
MarAQU\_UPF0042 LREAITNEKRLLEPLKGLADLVNNTGLSMYELRDMIKQVRA-GR---KQQLLALLVFESF 173  
NizSp\_ebA3650 LAEAIQESERDALASIAELG-HRIDTSELHANTLRAWKDFLAI-TEG-LTLMQVFSF 167  
AtoEur\_NEL849 LEEAIRRENEALATLTLGLG-HRIDTSELHANTLRAWKDFLAI-TEG-LTLMQVFSF 167  
AcisP\_ACIAD3059 LNECIQERKQLLPIQFRSTVHIDTDDKSHVHLKHTLLSKLQ-GR---QSDKLLIIVVFESF 168  
ZymMob\_ZM01325 MEDGISEERAFAPVREIADFLIDTTTTSSHSLSQSELRQQA-PE---NSVAPNVLSLFS 190  
DesRed\_UPF0042 VLKVIQERREKLLRIRGRATKVIDTSEMSVHELAEMLRTRLL-GK---NSNRLITVVFESF 183  
TheeCar\_UPF0042 ISEGIERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 173  
HalOer\_UPF0042 VLDAIRKEREHLLEIKGKANKIIDTSSKLSKQELNHLKVVYSSYFI---GKQSMVTVVFESF 169  
DesBhaf\_DS4845 ILEGIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 173  
MooThe\_YP\_429136 ILEGIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 173  
CarHyd\_YP\_359144 ILDNKKERKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 173  
SymThe\_STH186 VLDGIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 171  
CloAce\_CAC0511 ILEGIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 171  
CloTet\_CTC02495 ILEGIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 171  
CloBei\_ZP\_00909349 VLTGITQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 171  
CloPer\_CPE0354 IITGITSEERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 171  
AlkMet\_UPF0042 ILENGITREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 170  
IvdGInERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 169  
TheeTen\_TTE1834 IVDGInERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 169  
CloThe\_UPF0042 LIKGIKTEREILSQIRKNATYIIDTSLNTPRQLKEILAFVFGK-GR---PD-GMIVNIVVFESF 170  
CalcSac\_ZP\_00884966 ILEAIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 175  
BacThu\_ZP\_00739740 PLKGIERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 176  
BacWei\_UPF0042 PLKGIERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 176  
BacAnt\_GBAA5384 PLKGIERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 176  
BacCer\_UPF0042 PLKGIERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 176  
GeoKau\_GK3066 PLEGIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 179  
GeoThe\_GTNG\_3015 PLEGIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 179  
BacCoa\_UPF0042 PLEGIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 177  
PlegIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 178  
BacSub\_YvcJ PLEGIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 177  
BacABC\_ABC3036 PLEGIQERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 177  
BacHal\_BH3569 PLDGIKKERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 178  
OceThe\_OB2468 PLDGIKKERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 176  
LisInn\_lin2617 VLDGINAERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 174  
LisWel\_lwe2422 VLDGINAERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 174  
LisMon\_Sp. VLDGINAERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 174  
ExiSib\_UPF0042 PLIGIRKERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 171  
EntcFae\_EF0766 VTEGIRKERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 173  
EntcFae\_UPF0042 ITEGIRKERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 173  
LacPla\_lp\_0779 VMDGIRKERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 173  
LacSak\_YP\_395138 LMDGIRKERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 173  
LacCas\_YP\_806200 LMDGIRKERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 174  
LacSal\_YP\_536062 ILDGIRKERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 174  
LacBre\_YP\_794827 VLEGISREKREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 174  
PedPen\_YP\_803988 VADGVRKERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 174  
StrMut\_Smu\_1306c VLDGIALERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 175  
StrPyo\_Sp. VLDGIRLERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 175  
StrAga\_gbs0576 VLDGIRLERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 175  
StrPut\_str0831 VLDGIRLERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 175  
StrPne\_Sp1566 ILDGIRLERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 175  
StrSan\_YP\_001034791 ILDGIRLERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 175  
StrSui\_UPF0042 VLDGIRLERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 174  
LactLac\_L18850 TLDGITKERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 174  
LacReu\_ZP\_01164767 ILDGIRLERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 181  
LacAci\_LBA0691 LLDGIRLERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 176  
LacDel\_YP\_618706 LLDGIRLERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 188  
LacGas\_YP\_815115 LLDGIRLERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 174  
LacJoh\_LJ0866 LLDGIRLERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 174  
StaAur\_Sp. LINAINDERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 182  
StaEpi\_SE0548 LIDAINERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 182  
StaHae\_SH2124 LMDSILEKREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 183  
StaSap\_SSP1952 LIESINERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 182  
FusNuc\_FN1089 LLRSILKEREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 169  
GloVio\_glr4163 LLAIRAERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 177  
TheThe\_TTHA0319 LMRERIAERREKLLRIRGRATHIIDTSDLSAQLEKILKALFAGERE---YERMTITVVFESF 159

LeiXyl\_Lxx11490 GFKYGLPADADLVADARFLPNFVKPELRYTGLDEVVRNDVLQONGAEFFIESYLEALR 239  
StpAve\_SAV6292 GFKYGLPADADLVADARFLPNFVKPELRYTGLDEVVRNDVLQONGAEFFIESYLEALR 282  
MycTubCD1551\_MT1464 GFKYGLPADADLVADARFLPNFVKPELRYTGLDEVVRNDVLQONGAEFFIESYLEALR 245  
MycTubH37Rv\_RV1421 GFKYGLPADADLVADARFLPNFVKPELRYTGLDEVVRNDVLQONGAEFFIESYLEALR 245  
MycSme\_MSMEG3088 GFKYGLPADADLVADARFLPNFVKPELRYTGLDEVVRNDVLQONGAEFFIESYLEALR 257

Anhang

NocPar_nfa358930	GFKYGVPLDADMLDVRFLPNPHWIPELREHSGQETVSEYVLSRPGAQDYLTCHHLVD	256
CorEff_CE1710	GFKHGSPRDADFIIDARFLPNPFVWVPLRPFGRVDFVSDYVLSQKGAQFLDNFIAMLD	258
BifLon_BL0705	GFKYGMPIADADVFADVRFLPNPFVWVPLRPFGRVDFVSDYVLSQKGAQFLDNFIAMLD	270
ActPle_YP_00133926	GFKYGLPADADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	228
HaeDuc_HD0584	GFKYGLSADADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	228
ActSuc_	GFKYGLPADADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	229
ManSuc_MS1718	GFKYGLPADADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	232
HaeInf_AAC22801	GFKYGLPADADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	231
PasMul_PM0169	GFKYGLPADADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
HaeSom_ZP_00132582	GFKYGLPADADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
EscColSp_YhbJ	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
ShiPle_YhbJ	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
SalEntATCC9150_YhbJ	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
SalTyp_YhbJ	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
SalEntTy2_T3240	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
KlePne_P17163	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
EntSp_	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
YerEnt_ZP_00834134	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
YerMol_ZP_00827279	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
YerFre_ZP_00828963	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
YerPes_Sp_	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
YerPse_YPTB3529	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
YerBer_	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
SerPro_ZP_01538297	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
ErwCar_ECA0285	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
PhorLum_plu4044	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
ProMir_AAC64575	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	228
SodGlo_SG0196	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
PhoPro_PLU4044	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
VibAng_	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	227
VibAlg_	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	229
VibPar_VP2673	GFKHGIPIDADYVDFVRFLPNPHWIPELRPMGTGLDQKPVVDFLEQRTEVHNFIYQTRNYLE	229
VibHar_AAF72890	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	229
VibVul_VV0445	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	229
VibCho_VC2532	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	229
VibSpl_V12B01_07423	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	231
VibFris_VF0384	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	229
AerHyd_AHA_3920	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	229
AerSal_ABO88502	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	229
IdiBal_OS145_05430	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	229
IdiLoi_IL0393	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
AltBac_ATW7_18740	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
PseHal_PSHaa2554	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
PseTun_PTD2_17262	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
AltDeMac_MADE_14619	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
PseAtl_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
VibAlg_CPS_4546	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
SheBal_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
ShePut_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
SheOne_SO3964	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
SheDef_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
SheFri_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
SheAma_Sama_3091	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
SheLoi_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
SheWoo_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
MarAqu_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
AzoSp_eBa3650	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	233
NitEur_NEL1849	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	227
ActSp_ACIAD3059	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	228
ZymMob_ZMO1325	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	240
DesRed_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	253
TheCar_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	233
HalOre_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	229
DesDHaf_DSY4845	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	235
MoThe_YP_429136	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	237
CarHyd_YP_359144	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	231
SymThe_STH186	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	237
CloAce_CAC0511	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	231
CloTet_CTC02495	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	231
CloBei_ZP_00909349	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	231
CloPer_CPE0354	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	231
AlkMet_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	231
ThezEth_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	230
ThezTen_TTE1834	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	230
CloThe_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	230
CalSac_ZP_00884966	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	235
BacThu_ZP_00739740	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	236
BacWei_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	236
BacAnt_GBAA5384	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	236
BacCer_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	236
GeoKau_GK3066	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	239
GeoThe_GTNG_3015	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	239
BacCoa_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	237
BacLic_YvcJ	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	238
BacSub_YvcJ	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	238
BacCla_ABC3036	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	237
BacHal_BH3569	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	238
OceThe_OB2468	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	236
LisInn_lin2617	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	234
LisWel_lwe2422	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	234
LisMon_Sp_	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	234
ExiSib_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	233
EntcFae_EF0766	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	231
EntcFae_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	233
LacPla_lp_0779	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	233
LacSak_YP_395138	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	233
LacCas_YP_806200	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	234
LacSal_YP_536062	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	234
LacBre_YP_794827	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	233
PedPen_YP_803988	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	234
StrMut_Smu_1306c	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	235
StrPyo_Sp_	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	235
StrAga_gbs0576	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	235
StrThe_str0831	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	235
StrPne_SP1566	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	235
StrSan_YP_001034791	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	235
StrSui_UPF0042	GFKYGLPSDADYVDFVRFLPNPHWIPALRPLTGLDAPVIAAFLEQHQSVLSLKYQIESFIE	234



Anhang

LactLac_L188550	GFKYGLPLDADLVDFVDFRFLPNPHYITELRDKNGTKDEVYDYVMEHPQSEEFYENLMQMLV	234
LacReu_ZP_01164767	GFKYGLPLDADIVMDVDFRFLPNPHYIPELKHLTGNDPAVQNYVMQSPKAEFYQHLRSLLE	241
LacAci_LBA0691	GFKYGLMPIDADIVMDVDFRFLPNPHYIPELRPFPTGLDKRRVFDYVMKKEETQVFYKRLDMLL	236
LacDel_IP_618706	GFKYGLMPIDADIVMDVDFRFLPNPHYIPELRPFPTGLDKRRVFDYVMKDETKVFYKRLDMLL	246
LacGas_YP_815115	GFKYGLIPIDADIVMDVDFRFLPNPHYIPQLKPFPTGLDRRVFDYVMSKKEETKFFYAKFLDMLL	234
LacJoh_LJ0866	GFKYGLIPIDADIVMDVDFRFLPNPHYIPQLKPFPTGLDRRVFDYVMSKKEETKFFYAKFLDMLL	234
StaAur_Sp.	GFKHGIQMDADLVDFVDFRFLPNPHYVVDLRPLTGLDKVVDYVMSKKEETIFFEKLTDLLD	242
StaEpi_S80548	GFKHGIQMDADLVDFVDFRFLPNPHYVVDLRPLTGLDEPVYVMSKKEETQIFFDKLTDLLK	242
StaHae_SH2124	GFKHGIQMDADLVDFVDFRFLPNPHYVVDLRPLTGLDEPVYVMSKKEETIFFEKLMDLLK	243
StaSap_SSP1952	GFKHGIQMDADLVDFVDFRFLPNPHYVVDLRPLTGLDEAVYVMSKKEETNIFFEKLIDLLK	242
FusNuc_FN1089	GFKYGLIPIDADIVMDVDFRFLPNPHYIPQLKELNGFDEEVYVLSQKESKFFYKRLDMLL	229
GloVio_glr4163	GFKRGPVDAQFVLDIRFLPNPHYVVDLRPLTGLDVGVAEYVFAEQSQATYRSLLEFLR	237
TheThe_TTHA0319	GFKWGPQQEADLVLDVDFRFLPNPHYDPAIRPRTGLDPEVRYVFS-EAAEPPYRALLAVAG	218
	*: . : * * : * * : * : *	
LeiXyl_Lxx11490	PIFAGYQRNKRHATIAVCGTGGKRRSVAIAEELAAARLSLPLA----VSIKHR----D	291
StpAve_SAV6292	LIAAGYRRGKRYVTIAVCGTGGKRRSVATSEKLAARL-AAEGVE----TVVVRH----D	333
MycTubCDC1551_MT1464	LVVDGYRRGKRYMTIAVCGTGGKRRSVAIAEALMGLLRSDQQLS----VRALHR----D	297
MycTubH37Rv_RV1421	LVVDGYRRGKRYMTIAVCGTGGKRRSVAIAEALMGLLRSDQQLS----VRALHR----D	297
MycSme_MSMEG3088	VVIDGYRRGKRYMTIAVCGTGGKRRSVAIAEALAEELRGGDGLT----VRVLRH----D	309
NocPar_nfa358930	LTTSGYRQEGKRYMTIAVCGTGGKRRSVAIAEALGELIGADTSAESADVVRVVRH----D	312
CorEff_CEL710	DMLPGYRHGKRFNITVIGCTGGKRRSVAVSEELARRLGERPDL----VSVVHR----D	310
BifLon_BL0705	IALLEGYQEDKHVYTVIAVCGTGGKRRSVAVSEELARRLRAH-GLN----VTVSAR----E	321
ActPle_ZP_00133926	MWLPMLEKNNRSYLTAIGCTGGKRRSVFIAEQQLAKYFQSR----DKDVQIRH----S	279
HaeDuc_HD0584	TWLPMLEKNNRSYLTAIGCTGGKRRSVFITEQLAKYFQSR----GKNVQIRH----S	279
ActSuc_	TWLPMLEKNNRSYLTAIGCTGGKRRSVYIAQQLGEYFQDK----GKHKIQHK----S	280
ManSuc_MS1718	TWLPMLEKNNRSYLTAIGCTGGKRRSVYIAQQLGEYFQAK----GKVKIQHK----S	283
HaeInf_AAC22801	TWLPMLEKNNRSYLTAIGCTGGKRRSVYIAQQLGEYFQAK----GKTVKIQHK----S	282
PasMuc_PM0169	TWLPMLEKNNRSYLTAIGCTGGKRRSVYITEQLGEYFQAK----GKNVQIRH----S	278
HaeSom_ZP_00132582	NWLPMLEKNNRSYLTAIGCTGGKRRSVYIAQQLGEYFQAK----GKVKIQHK----S	278
EscColSp_YhbJ	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GKNVQSRH----T	278
ShiFlu_YhbJ	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GKNVQSRH----T	278
SalEntATCC9150_YhbJ	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GKNVQSRH----T	278
SalTyp_YhbJ	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GKNVQSRH----T	278
SalEntTy2_T3240	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GKNVQSRH----T	278
KlePne_PL7163	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GKNVQSRH----T	278
EntSp_	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GKNVQSRH----T	278
YerEnt_ZP_00834134	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRAR----GKNVQSRH----T	278
YerMol_ZP_00827279	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRAR----GKNVQSRH----T	278
YerFre_ZP_00828963	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRAR----GKNVQSRH----T	278
YerPes_Sp.	QWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRAR----GKNVQSRH----T	278
YerPse_YPTB3529	QWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRAR----GKNVQSRH----T	278
YerBer_	QWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRAR----GKNVQSRH----T	278
SerPro_ZP_01538297	QWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRAR----GKNVQSRH----T	278
ErwCar_ECA0285	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GKNVQSRH----T	278
PhorLum_plu4044	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GKNVQSRH----T	278
ProMir_AAC64575	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GKNVQSRH----T	279
SodGlo_SG0196	LWLPMLETNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GKNAQSRH----T	278
PhoPro_PLU4044	TWLPMLEKNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRSR----GQQVQIRH----T	278
VibAng_	SWLPMLEKNNRSYVTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLADYFRHQ----GQQVQVRH----T	278
VibAlg_	NWLPMLEKNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYLTQQIGYEFQAK----GHQVQIRHT--S	280
VibPar_VP2673	TWLPMLEKNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYLTQQIGYEFQAK----GHQVQIRHT--S	280
VibHar_AAF72890	TWLPMLEKNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYLTQQIGYEFQAK----GHQVQIRHT--S	280
VibVul_VV0445	HWLPMLEKNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYLTQQIGYEFQAM----GHTVKIRHT--T	280
VibCho_VC2532	YWLPMLEKNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYLTQQIGYEFQAL----GHQVQIRHT--S	280
VibSpl_VL2B01_07423	QWLPMLEKNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYLTQQIGYEFQAL----GHQVQIRHA--S	282
VibFis_VF0384	TWLPMLEKNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYITQQIGYEFQAL----GKQVQIRH--T	280
AerHyd_AHA_3920	TWLPMLERNNRSYVTVIGCTGGKRRSVFIAEQLAGAFRL--GKNVQIRH--T	280
AerSal_ABO88502	TWLPMLERNNRSYVTVIGCTGGKRRSVFIAEQLAGAFRL--GKNVQIRH--T	280
IdiBal_O8145_05430	TWLPYFRSNNRSYLTIAMGCTGGKRRSVLAETLAEQFRSE----GTHVQVRHT--E	278
IdiLoi_IL0393	TWLPHFQSNRSYLTIATGCTGGKRRSVYISQQLAEFRBQK----AVKVQVRHT--E	278
AltBac_ATW7_18740	TWLPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYLAQTIQESFAVT----HPNVKIRH--E	278
PseHal_PSHaA2554	TWLPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYLAQTIQESFAMS----HPNVKIRH--E	278
PseTun_PTD2_17262	TWLPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYLAQTIQESFAMS----HPNVKIRH--E	278
AlteMac_MADE_14619	TWLPMLERNNRSYVTVAGCTGGKRRSVYIAQTLKTFSEI----HPDVQIRH--E	278
PseAtI_UPF0042	TWLPMLERNNRSYVTVAGCTGGKRRSVYVVEMLAKTFSTS----HPDVQIRH--E	278
ColPsy_CPS_4546	TWLPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEMLANFRKE----RDDIQTHR--D	278
SheBal_UPF0042	TWLPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLAKRFNSG----KHKVYARH--E	278
ShePut_UPF0042	TWLPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLAKRFNSG----KHKVYARH--E	278
SheOne_SO3964	TWLPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLAKRFNSG----KHKVYARH--E	278
SheDef_UPF0042	TWMPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLAKRFNSG----KHVVNARH--E	278
SheFri_UPF0042	TWMPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLAKRFNSG----KHTVNARH--E	279
SheAma_Sama_3091	TWLPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEQQLAKRFNSG----HHKVEARH--E	278
SheLoi_UPF0042	TWLPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYVTDQLAKLFNKG----KHKVQARH--E	278
SheWoo_UPF0042	TWLPMLERNNRSYLTVAGCTGGKRRSVYVTEQLAKLFSQS----KHTVQARH--E	278
MarAgu_UPF0042	TWLPSPADSNRSYMTISIGCTGGKRRSVYVCEQLGRYFRDN----YRNVQVRHT--E	284
AzoSp_eb3650	TWLPSPYARDNRSYLTVAGCTGGKRRSVYIAEWLGRHFSDT----LRVLVRRHSAARR	281
NitEur_NE1849	TWLPYIARDNRSYLTVAGCTGGKRRSVYFAEKALHAFHDS----AHVLVRRH--G	277
ActSp_ACTAD3059	KWLPVFAEGHRHYMTVSIIGCTGGKRRSVYVDRLKKALEAK----WSIQVLRH--E	278
ZymMob_ZMO1325	FLLPYRIDTGRSYVIAFACTGGKRRSVYVAEWIARLRQA----HFSLTIHRDLKLP	305
DesRed_UPF0042	FLVPHYQRGKATLMIAIGCTGGKRRSVLTNLKGEVLSSE----K-GYRVNVRH--D	294
ThesCar_UPF0042	FLVPHYIKRGSQQLIAVIGCTGGKRRSVFVANKIEGLRN----K-GYRVNVRH--D	284
HalOre_UPF0042	FLLEYSRREGKSHFTIAIGCTGGKRRSVYTAIKLKEFLLS----K-GYHVVEH--D	280
DesbHaf_DSY4845	FILPHYVREGKRRHLVIGCTGGKRRSVAIAERIGLEFLQE----R-SYMSVKH--D	286
MooThe_YP_429136	FLIPHYLQEGKSHLVVIGCTGGKRRSVTLANKLGEQLLQ----E-NYSVTVKH--D	286
CarHyd_YP_359144	FLMPFYQREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVAIANFLARLTLEB----K-NYEVYLRH--D	282
SymThe_STH186	FLLPHYVAREGKSLTIAIGCTGGKRRSVCLANRLAHWIRE----R-GYSVSVH--D	288
CloAce_CAC0511	FLIPNYLKEGKRQLIVSIGCTGGKRRSVTIANEYERLKN----D-GETVNIHR--D	282
CloTet_CTC02495	FLIPHYTERGKRQLVIAIGCTGGKRRSVSIANSYKLEEE----K-GHKVNIHR--D	282
CloBei_ZP_00909349	YLIPNYIKRGSQQLIISIGCTGGKRRSVAIANEYERLKN----E-NYNSKIEHR--D	282
CloPer_CPE0354	FLIPNYIKRGSQQLIISIGCTGGKRRSVAIANALYKLLC----K-NFHTVLEHR--D	282
AlkMet_UPF0042	FLIPHYVQEGKSNLVISIGCTGGKRRSVTIAHVHQLKLD----K-GHRVTLSHR--D	281
TherEth_UPF0042	FLIPYIYREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVTIANALYEFLLK----E-DYSVILHR--D	280
TherTen_TTE1834	FLIPYIYREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVAIANALYDLKCK----E-DYSVVNHR--D	280
CloThe_UPF0042	FLIPNYIKRGSQQLVIGCTGGKRRSVAISEALFSLYLCG----R-EHRVFDHR--D	281
CalSac_ZP_00884966	FLIPNYAERGAQLVIAIGCTGGKRRSVTIAEELFELIKN----N-GYKASIFHR--D	286
BacThu_ZP_00739740	FMLPHYKREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVLTLEYLGHKHLK----P-EYSVHVSHR--D	286
BacWei_UPF0042	FMLPHYKREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVLTLEYLGHKHLK----P-EYSVHVSHR--D	286
BacAnt_GBAA5384	FMLPHYKREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVLTLEYLGHKHLK----P-EYSVHVSHR--D	286
BacCer_UPF0042	FMLPHYKREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVLTLEYLGHKHLK----P-DYSVHVSHR--D	286
GeoKau_GK3066	FMLPHYQREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVALAEYIARHFS----D-DYKTVVSHR--D	289
GeoThe_GTNG_3015	FMLPHYQREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVALAEYIARHFS----A-DYKTVVSHR--D	289
BacCoo_UPF0042	FMLPHYKREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVALAEYIGHFPE----K-DYHTTISHR--D	287
BacLic_YvcJ	FMLPSYKREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVTLAEYLADYFK----K-DYTHVTHR--D	288
BacSub_YvcJ	FMLPSYKREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVTLAEYLADYFK----K-DYTHVTHR--D	288
BacCla_ABC0306	FMLPHYKREGKSNLVIAIGCTGGKRRSVTLAEYFCARHE----A-KYDAYTSHR--D	287

# Anhang

BacHal_BH3569	FMLPQYKREGKSOVVIIGCTGGQHRSVTLAEHFQVFA-----N-EYMMHVSHR-----D	288
OceIhe_OB2468	FMLPQYKREGKSQLVVAIGCTGGQHRSVTLAEHFQVFLS-----N-GYTHVSHR-----D	286
LisTnn_lin2617	FTLPFYKREGKTQLVIAIGCTGGQHRSVALTQYVGRKAIQ-----Q-KYETTISHR-----D	284
LisWel_lwe2422	FTLPFYKREGKTQLVIAIGCTGGQHRSVALTQYVGRKAIQ-----Q-KYETTISHR-----D	284
LisMon_Sp.	FTLPFYKREGKTQLVIAIGCTGGQHRSVALTQYVGRKAIQ-----Q-KYETTISHR-----D	284
ExiSib_UPF0042	FLIPQYKREGKSQLVVALGCTGGQHRSTITFAEALSKKFK-----N-QYHIVNTHR-----D	281
EntcFae_EF0766	TVLPGYKREGKSSVTLAIGCTGGQHRSVALTERVLAELKE-----E-DYHVNITHR-----D	284
EntcFaeC_UPF0042	TVLPGYKREGKSSVTLAIGCTGGQHRSVALTERVLANALG-----K-NYKVNITHR-----D	283
LacPla_lp_0779	SIMPGYKREGKSSVTLAIGCTGGQHRSVALTQRIGELAL-----K-HYKVNISHR-----D	283
LacSak_YP_395138	SIMPGYKREGKTSVTLAIGCTGGQHRSVALAQRLADDLA-----V-DYPVDVTHR-----D	283
LacCas_YP_806200	ETMPKYKREGKTSVTLAIGCTGGQHRSVAFARERIGKAFS-----D-AYAVDITHR-----D	284
LacSal_YP_536062	YVIPGYIAEGKSNVTLAIGCTGGQHRSVALAEIRGNELS-----K-EYPVVMISHR-----D	284
LacBre_YP_794827	TIVPGYKQEGKSSVTLAIGCTGGQHRSVALTQRLGQALG-----N-TYPVHVTHR-----D	283
PedPen_YP_803988	DIMPQYKQEGKSNVTLAIGCTGGQHRSVALAEIRLAKDLS-----K-KYVTVNISHR-----D	284
StrMut_Smu_1306c	PILPGYKQEGKSVTLAIGCTGGQHRSVAFARLQADLG-----Q-NWTVNESH-----D	285
StrPyro_Sp.	PILPAYKQEGKSVTLAIGCTGGQHRSVAFARLQADLS-----T-DWVSNESH-----D	285
StrAga_gbs0576	PILPGYKQEGKSVTLAIGCTGGQHRSTAFARLSEDLK-----A-DWTVNESH-----D	285
StrThe_str0831	PILPGYKQEGKSVTLAIGCTGGQHRSVAFARLQADLK-----N-DWTVNETH-----D	285
StrPne_SP1566	PILPSYKQEGKSVTLAIGCTGGQHRSVAFARLQADLS-----K-NWVSNESH-----D	285
StrSan_YP_001034791	PILPGYKQEGKSVTLAIGCTGGQHRSVAFARLQADLA-----K-NWVNSSSH-----D	285
StrSui_UPF0042	PILPGYKQEGKSVTLAIGCTGGQHRSVAFARLQADLE-----K-NWVNSSSH-----D	284
LactLac_L188550	PILPAYKQEGKSVTLAIGCTGGQHRSVAFARVSAALG-----D-KWHLNVSHR-----D	284
LacReu_ZP_01164767	IALPGYKQEGKSSVTLAIGCTGGQHRSVTIANKLSADLKE-----K-GYKVNITHR-----D	292
LacAci_LBA0691	TAIPGYIKQEGKSLTIAIGCTGGQHRSVIAQQIARDLS-----K-KYPVDITHR-----E	286
LacDel_YP_618706	TAIPGYIDEGKSLTIAIGCTGGQHRSVIAQQIARDLS-----E-KYPVDITHR-----E	298
LacGas_YP_815115	TAIPGYIABGKSLTIAIGCTGGQHRSVSIARQLAVDLA-----K-KYPVDISHR-----E	284
LacJoh_LJ0866	TAIPGYIABGKSLTIAIGCTGGQHRSVSIARQLAVDLA-----K-KYPVDISHR-----E	284
Staur_Sp.	FMIPGYKQEGKSQLVIAIGCTGGQHRSVALAEIRLGNVLENEV-----F-EYNVYVHHR-----D	294
StaePi_SE0548	FMIPGYKQEGKSQLVIAIGCTGGQHRSVALAEIRLGNVLENEI-----F-EYNVYVHHR-----D	294
StaeHae_SH2124	FMIPGYKQEGKSQLVIAIGCTGGQHRSVALAEIRLGNVLENEI-----F-EYNVYVHHR-----D	295
StaeSap_SS1952	FMVPGYKQEGKSQLVIAIGCTGGQHRSVALAEIRLGNVLENEI-----F-EYNVYVHHR-----D	294
FusNuc_FN1089	FLIPQYIKQEGKSLTISIGCSGQHRSVTFVNLKLAEDLNKSVLE-----Y-INVYVSHR-----E	284
GloVio_glr4163	FLHLQYQDRKSQLLIAIGCTGGQHRSVAFVRLSGDLAAG-----FACRPSHR-----D	288
TheThe_TTHA0319	LAAEGARABGRAFYTVAVGCTGGQHRSVAVAEIRLAEELSGR-----FAVEVHHR-----D	268

! . . : \* \* \* \* \*

LeiXyl_Lxx11490	LGRE-----	295
StpAve_SAV6292	MGRE-----	337
MycTubCDC1551_MT1464	LGRE-----	301
MycTubH37Rv_RV1421	LGRE-----	301
MycSme_MSMEG3088	LGRE-----	313
NocFar_nfa358930	LGRE-----	316
CorEff_CEL1710	INRN-----	314
BifLon_BL0705	QHKRHSS-----	328
ActPle_ZP_00133926	LEKHHKK-----	286
HaeDuc_HD0584	LEKYHKKT-----	287
ActSuc_	LEKHKNR-----	287
ManSuc_MS1718	LEKHHKNSA-----	293
HaeInf_AAC22801	LEKNKKI-----	289
PasMul_PM0169	LAKHKKANTQ-----	288
HaeSom_ZP_00132582	LEKHTQNK-----	286
EscColSp_YhbJ	LEKRKP-----	284
ShiFle_YhbJ	LEKRKP-----	284
SalEntATCC9150_YhbJ	LEKRKT-----	284
SalTyp_YhbJ	LEKRKT-----	284
SalEntTy2_T3240	LEKRKT-----	284
KlePne_P17163	LEKRKS-----	284
EntSp_	LEKRKT-----	284
YerEnt_ZP_00834134	LEKRK-----	283
YerMol_ZP_00827279	LEKRKQ-----	284
YerFre_ZP_00828963	LEKRK-----	283
YerPes_Sp.	LEKRKQ-----	284
YerPse_YPTB3529	LEKRKQ-----	284
YerBer_	LEKRKQ-----	284
SerPro_ZP_01538297	LEKRKQ-----	284
ErwCar_ECA0285	LEKRKPS-----	285
PhorLum_plu4044	LEKRK-----	283
ProMir_AAC64575	LEKRK-----	284
SodGlo_SG0196	LEKSKS-----	284
PhoPro_PLU4044	LESK-----	282
VibAng_	LEKQ-----	283
VibAlg_	LEKNAKE-----	287
VibPar_VP2673	LEKNAKE-----	287
VibHar_AAF72890	LEKNVKE-----	287
VibVul_VV0445	LEKKNKE-----	287
VibCho_VC2532	LEKQSS-----	286
VibSpl_V12B01_07423	LEKHQQG-----	289
VibFis_VF0384	LEKH-----	284
AerHyd_AHA_3920	LDKSAPQF-----	288
AerSal_ABO88502	LDKSTPOH-----	288
IdiBal_OS145_05430	LSK-----	281
IdiLoi_IL0393	LKTHG-----	283
AltBac_ATW7_18740	QEK-----	281
PseHal_PSHaa2554	QEK-----	281
PseTun_PTD2_17262	QEK-----	281
AlteMac_MADE_14619	LNQ-----	281
PseAtI_UPF0042	LNQ-----	281
ColPsy_CPS_4546	IDIKST-----	284
SheBal_UPF0042	LNNAKA-----	284
ShePut_UPF0042	LDNAKA-----	284
SheOne_SO3964	LSHAKA-----	284
SheDef_UPF0042	LGDVKA-----	284
SheFri_UPF0042	LNISDTNN-----	287
SheAma_Sama_3091	LN-aka-----	283
SheLoi_UPF0042	LKHD-----	282
SheWoo_UPF0042	LSND-----	280
MarAqu_UPF0042	LPHLQARGEI-----	294
AzoSp_eba3650	IVDHGADMADK-----	292
NitEur_NE1849	LAEYKPHYARR-----	288
AcisP_ACIAD3059	MKHS-----	283
ZymMob_ZMO1325	LLSQSNRIRAGKAYQGG-----	323
DesRed_UPF0042	IMRV-----	298
ThesCar_UPF0042	IKHNIVEPC-----	293
HalOre_UPF0042	ISK-----	283
DesbHaf_DSY4845	AAR--NRKGDKSK-----	297
MooThe_YP_429136	VVR--YLSGTGNR-----	299

CarHyd_YP_359144	LEK--HREE-----	289
SymThe_STH186	MPRPADRSDEEQP---	302
CloAce_CAC0511	IEDINKGGKKL-----	294
CloTet_CTC02495	IHDNKGKKL-----	294
CloBei_ZP_00909349	VAEDLHKGKKL-----	294
CloPer_CPE0354	INEDINRGDRKL-----	294
AlkMet_UPF0042	SGETREKKES-----	292
TherEth_UPF0042	IGEE-----	284
TherTen_TTE1834	IGEE-----	284
CloThe_UPF0042	TDKGRSNRR-----	291
CalSac_ZP_00884966	IEKDIKG-----	293
BacThu_ZP_00739740	VEKKGH-----	293
BacWei_UPF0042	VEKKGH-----	293
BacAnt_GBAA5384	VEKKGH-----	293
BacCer_UPF0042	VEKKGH-----	293
GeoKau_GK3066	MERRKDIHR-----	298
GeoThe_GTNG_3015	MERRKEAHR-----	298
BacCoa_UPF0042	IKRKEERK-----	296
BacLic_YvcJ	IEKKSrk-----	295
BacSub_YvcJ	IEKKSrk-----	295
BacCla_ABC3036	INRKKANSR-----	296
BacHal_BH3569	VEKGER-----	295
OceThe_OB2468	IDKRVL-----	293
LisInn_lin2617	MKRRKER-----	291
LisWel_lwe2422	MKRRKGR-----	291
LisMon_Sp.	MKRRKGR-----	291
Exisib_UPF0042	YVHAEEK-----	289
EntcFae_EF0766	RLKRRKTVNRS-----	295
EntcFae_UPF0042	KDKRRKTVNRS-----	294
LacPla_lp_0779	IEKRRKTVNRS-----	294
LacSak_YP_395138	MKRRKESVNRS-----	294
LacCas_YP_806200	IKKHKETVNRS-----	295
LacSal_YP_536062	MNKRKTVNRS-----	295
LacBre_YP_794827	IEKRRKESANRS-----	294
PedPen_YP_803988	AHKRRKTVNRS-----	295
StrMut_Smu_1306c	KNRKRKTVNRS-----	296
StrPyo_Sp.	QNRKRKTVNRS-----	296
StrAga_gbs0576	KNRKRKTVNRS-----	296
StrThe_str0831	KDRRKEKTVNRS-----	296
StrPne_SP1566	KDRRKEKTVNRS-----	296
StrSan_YP_001034791	KNRKRKTVNRS-----	296
StrSui_UPF0042	KDRRKEKTVNRS-----	295
LactLac_L188550	KDRRKEKTVNRS-----	295
LacReu_ZP_01164767	IEKAK-----	297
LacAci_LBA0691	ISRYIRK-----	293
LacDel_YP_618706	ISRYLRK-----	305
LacGas_YP_815115	ISRYIGQ-----	291
LacJoh_LJ0866	ISRYIGQ-----	291
StaAur_Sp.	AHIESGEEK-----	303
StaEpi_SB0548	AHIESGER-----	302
StaHae_SH2124	AHIESGVRK-----	304
StaSap_SSP1952	AHVESGVKHKDEKN---	308
FusNuc_FN1089	KELGHW-----	290
GloVio_glr4163	LAVNRLQELSR-----	299
TheThe_TTHA0319	VEREG-----	273

### 7.6.3. RNABindR-Vorhersagen

Dargestellt ist die *optimal prediction*.

„+“ zeigen potenziell an der Bindung von RNA beteiligte Aminosäuren an.

>ActSuc\_ZP\_00733020

```
MELIIISGRSGAGKSVALRALEDIGYCYVDNLPIDLLPQLADILSQSQASAAISLDIRNLPNSSQHLDEILTELE
-----
NKHQIKIIFLDADRSTLIRRYSDSRRLHPLSVQNQDLSLEAAIDAEQIQLDPLIQHANLIIDTAVLSTHELAERL
-----
REFLRGNSDKELKIVVESFGFKYGLPLDADYVFDVRFPLPNPHWNPSLRPMTGLEQPVDFLSKYEDVANFIYTTR
-----
NYIETWLPMLERNRSYLTAIGCTGGKHSVYIAQQLGEYFQDKGKHVKIQHKSLEKHKNR
-----
+++++-----+++++-----+++++-----+++++-----+++++
```

>BacSub\_YvcJ

```
MSVSESHDIQLVITITGMSGAGKTVAIQSFEDLGYFCVDNLPSSLPLPKFLELMKESNSKMSKVALVMDLRGREFFD
-----
RLIEALDEMAENPWITPRILFLDAKDSILVTRYKETRRSHPLAATGLPLEGIALERELLEELKGRSQIITYDTSDM
-----
KPRDLREKIVKHFATNQGETFTVNVMVSFGFKYGIPIADLVFDVRFPLPNPYIE SMRPLTGKDKDEVSSYVMKWNE
-----
TQKFNEKLIIDLFSFMLPSYKREGKSQVVIAIGCTGGQHRSVTLAENLADYFKKDYTHVTHRDIEKRSRK
-----
+++++-----+++++-----+++++-----+++++
```

>CloPer\_CPE0354

```
MRFVIVTGLSGAGKTEATRSLEDLGYFCVDNLPKLIKFAEACVQSEKIDKIALVIDIRGGIFDLDLESIEY
-----
LKANDFNYEILFLEASDEVLVKRFKETRRSHPLSPDGRITIGISEERMRLRELKDRADNIIDTSNYPINRLREKI
-----
NLLYGDGKPEQNLSITVLSFGFKYGIPIPSDDLVDVRFIPNPFYIPELKPFSGEDEPVKNYVLAQEETKGFLSR
-----
LSDMAEFLIPNYIKEGKRQLIISIGCTGGRHSVAIANALYKDLLCKNFHVTTLEHRDINEDINRGDRKL
-----
+++++
```

## Anhang

>CorEff\_CE1710

```
MQNTPGSTVPETATPVTSPASSPSAPETTFTPVIITGMSGAGLSTAARVLEDLGWFVTHNLPQMIPLVEMCAR
EDSPVDKVAVVCVDRSREFRGGLETTITELKLNLAPTVLFDAARDELIRRFDNVRRTHPLQGSQTLQVGIERE
-----+-----
RQMLSDLKEEADVVIDTSELSVHDLRRAIESSFRITAKRVQHVITIEFSGFKHGSPRDADFIIDARFLPNPFVWPE
-----+-----
LRPFRGVDPKPVSDYVLSQKGAGEFLDNFIAMLDMLPGYRHEGKNFITVIGIGCTGGHRSVAVSEELARRLGERP
-----+-----
DLDVSVVHRDINRN
-----+-----
```

>EntcFaec\_UPF0042

```
MTDNLQLVIITGMSGAGKTVAIQSFEDMGYFCIDNMPRLIPKFWELIKESGKVTKMALGVDLRSRSFFEEIQNM
LIEIENTNFIDTSLFLDASDEELVARYKETRRRAHPMAMDGLITBIRKERAILDDLKAQASVIDTTTLTPRQL
-----+-----
REKINESFKSKGDQGFRIEFVVSFGFKYGLPIDSDIVMDVRFPLPNPHYIPELRPLTGKQDPVYDYVMSFDETSFY
-----+-----
HKFLDLLETVLPGYIKEGKSSLTVAIGCTGGQHRVALTERLANALGKNYKVVNTHRDKDKRKETVNRS
-----+-----
```

>EntSp.\_ZP\_01590769

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCDNLPVLLPELARTLADRQISAAVSDVRNMPESPEVFEQAMSSLP
ETFTPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSSKNLSLESAIDEEEDLLEPLRSRADLIVDTSEMSVHELAEMLR
-----+-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRFPLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----+-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYIAEQADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRKT
-----+-----
```

>ErwCar\_ECA0285

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCDNLPVLLPELANTLAARNISAAVSDVRNMPESPEIFEHAMEQLP
PSFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSSKNLSLESAIDEEEDLLEPLRSRADLIDTSEMSVHELAEMLR
-----+-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRFPLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----+-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYIAEQADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRKPS
-----+-----
```

>EscColSp.\_YhbJ

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCDNLPVLLPDLARTLADREISAAVSDVRNMPESPEIFEQAMSNLP
DAFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSSKNLSLESAIDKEEDLLEPLRSRADLIVDTSEMSVHELAEMLR
-----+-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRFPLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----+-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYIAEQADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRKP
-----+-----
```

>HaeInf\_AAC22801

```
MGKLMEEIIISGRSGAGKSVALRALEDAGYYCVDNIPLDLPLQLTDILSQSQSSVAISLDIRNIPNSAHSKQTL
STLQKHHQIKIIFLEADRATLIRRYSDSRRLHPLSLKDLSEAAIDEEYRYLEPLIQHANLILDTHLSTHSLAE
RLREFLRGNSEKELKIIIVESFGFKYGIPLDADYVFDVRFPLPNPHWDPTLRPMTGLEAPVAEFLNSHTEVNEFIYL
TRHYIDTWLPMLEKNNRSYLTIAIGCTGGKHRSVYIAEQQLGEYFQAKGKTVKIQHKSLEARNKKI
-----+-----
```

>KlePne\_P17163

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCDNLPVLLPELARSLADRNIISAAVSDVRNMPESPEIFEQAMKNLP
AEFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSSKNLSLESAIDEEEDLLEPLRSRADLIVDTSEMSVHELAEMLR
-----+-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRFPLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----+-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYIAEQADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRKS
-----+-----
```

>LacCas\_YP\_806200

```
MTESLDLVIITGMSGAGKTVMQAFEDLGYFCVDNMPALLPKFWELVKESGKITKVALVVDLRSRAFYDQIIDM
LANLDNNAYVHSRILFLDATDEELVSRYKETRRSHPLAMEGRMLDGIKKERALLTELNRQAQVVIDTTLSRPLQ
REKIFLNFKESGSPAFHIEVMSFGFKYGLPIDADIVMDVRFPLPNPHYIKDYRPKTGLDPEVYNYVMDNEDAESF
YKIFYDLLSEIMPKYKAEKTSVTIAIGCTGGQHRSVAFARIGKAFSDAYAVDITHRIDKHKETVNRS
-----+-----
```

## Anhang

>LisMon\_Sp.

```
MASKQLKLVIIITGMSGAGKTVAMQSLLEDLGYFCVDNLPSSLKPFWELMKESDKMDKIALVMDLRGREFFDSDIEP
-----
ALDELDNNTNFITTKILFLEADDKVLVSRYKETRHHPLEPNGSVLDGINAERELLSDLKGRSQLVINTSNMAPRE
-----
LRERINNEFQTEDEKDI FNVQLMSFGFKYGIPI DADLVFVDFRFLPNPHYIDKMRPLTGLDEDVYEVVMKWPETQTF
-----
LDKLVLDLMMFTLFPYKREGKTLVIAIGCTGGQHRSVALT E FVGKAIQQKYETTISHRDMKRRKGR
-----
+++++-----+-----+++++
```

>MycTubCDC1551\_MT1464

```
MMNHARGVENRSEGGGIDVVLVTGLSGAGRGTAAKVLEDL GWYVADNLPQLITRMVDFGLAAGSRITQLAVVMD
-----
VRSRGFTGDLDSVRNELATRAITPRVVFMEASDDTLVRRYEQNRSSHPLQGEQTLAEGIAAERRMLAPVRATADL
-----
IIDTSTLSVGGLRDSIERAFGGDGGATT SVTVESFGFKYGLPMDADMVMDVRF LPNPHWVDEL RPLTGQHPAVRD
-----
YVLRHPGAAEFLESYHRLLSLVVDGYRREGKRYMTIAIGCTGGKHRSV AIAEALMGLLRSDQQLSVRALHRDLGR
-----
E
-
```

>NitEur\_NE1849

```
MQVIIISGLSGSGKSIALKVLEDSGYICVDNLPASLLVVLINHLQTQQHAYVAVAI DMRSGENITVLPWQLKMID
-----
KSIQIKFIFLEARTETLMQRFSETRRRHPLSDKNITL EEAIRREREALATLTGLGHHDITSSLRPNVLR AFIKDF
-----
IADSRSPSQLTLLFQSFYKHGIPLDADLVFDIRCLPNPFYDPQLKELTGHDP E VIRMESQPDASKMLRDISSF
-----
LGTWLPAYIRDNRAYLTVAIGCTGGQHRSVYFAEKLALHFHDSAHVLVRH RGLAEYKPHYARR
-----
+++++-----+-----+++++
```

>PhorLum\_plu4044

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPELAN TLADRDI SAAVSI DVRNMPESPEVFEEALTKLP
-----
ASFSPQLLFLDAERNTLIRRYSDTRRLHPLSSKNLSLESAIDQESD LLEPLRSRADLIIDTSEMSVHELAEMLR
-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRF LPNPHWDPKLRPMTGLDRPVAAFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQ LADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRR
-----
+++++-----+-----+++++
```

>ProMir\_AAC64575

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPELAKT LAERDAAAAVSI DVRNMPESPEIFEKALESL
-----
PAEYSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSTKNLSLESAIDTESD LLEPIRSRDVWIIDTSEMSVHELAEMLR
-----
TRLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRF LPNPHWDPKLRPMTGLDRPVAAFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----
YLELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQ LADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRR
-----
+++++-----+-----+++++
```

>SalEntATCC9150\_YhbJ

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPDLARTLADRQI SAAVSI DVRNMPESPEIFEQAMNNLP
-----
GAFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSSKNLSLESAIDKESD LLEPLRSRADLIVDTSEMSVHELAEMLR
-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRF LPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAAFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYIAEQ LADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRKT
-----
+++++-----+-----+++++
```

>SalEntTy2\_T3240

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPDLARTLADRQI SAAVSI DVRNIPESPEIFEQAMNNLP
-----
GAFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSSKNLSLESAIDKESD LLEPLRSRADLIVDTSEMSVHELAEMLR
-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRF LPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAAFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYIAEQ LADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRKT
-----
+++++-----+-----+++++
```

>SalTyp\_YhbJ

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPDLARTLADRQI SAAVSI DVRNMPESPEIFEQAMNNLP
-----
GAFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSSKNLSLESAIDKESD LLEPLRSRADLIVDTSEMSVHELAEMLR
-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRF LPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAAFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYIAEQ LADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRKT
-----
+++++-----+-----+++++
```

## Anhang

>SerPro\_ZP\_01538297

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLANTLAERNSSAAVSI DVRNMPESPEVFEYAMTQLP
DSFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSSKNLSLESAIDEESDLLEPLRSRADLI IDTSEMSVHELAEMLR
T-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRF LPNPHWDPKLRPMTGLDKPVASFDRHTEVHNFIYQTRSY
-----
LEQWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQ LADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRKQ
-----
+++++-----+-----+++++
```

>SheFri\_UPF0042

```
MKLIVIVSGRSGSGKSVALRVLEDLGYCYVDNLPPLPIGTLAQLKGSNDLVAISVDVRNIAEQGKVLQDQLALLE
-----
NDTEIISFFLNSNDKVLKRYSETRRHLPLSKNHISLQEA IKLEGRLEPIAKIVDHYIDTSALNIYELSDQVRQ
-----
ILGSDVKELVINVFESFGFKHGMPTEADFMFDVRF LPNPHWEIELRPFTGLDEPVQEFGRQPLVVKFIWQIENL
-----
FETWMPHLERNRNSYLTVAIGCTGGQHRSVYIADQL AKRFRQGSKHTVNARHRELNI SDTNN
-----
+++++-----+-----+++++
```

>Shifle\_YhbJ

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPDLARTLADREISAAVSI DVRNMPESPEIFEQAMSNLP
-----
DAFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSSKNLSLESAIDKESDLLEPLRSRADLIVDTSEMSVHELAEMLR
T-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRF LPNPHWDPKLRPMTGLDKPVAAFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYIAEQ LADYFRSRGKNVQSRHRTLEKRKP
-----
+++++-----+-----+++++
```

>SodGlo\_SG0196

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLASALAAVSI DVRNMPESPEIFEQAMDNLP
-----
QAFAPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSALNLSLESAIDEESDLLEPLRSRADLIVDTSEMSVHELAEMLR
T-----
RMLGKRERELTMVFESFGYKHGIPIDADYVFDVRF LPNPHWDPKLRPMTGLDRPVAAFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYIAEQ LADYFRSRGKNAQSRHRTLEKSKS
-----
+++++-----+-----+++++
```

>StaAur\_Sp.

```
MNNEKEKSKSELVVLTGLSGAGKSLVIQCLEDMGYFCVDNLPVLLPKFVELMEQGNP SLRKVAIAIDLRGKEL
-----
FNSLVAVVDKVKSESDVIDVMFLEASTEKLISR YKETRRRAHPLMEQGRSLINAINDEREHLSQIRSIANFVID
-----
TTKLSPKELKERIRRYEDEEFETFTINVT SFGFKHGIQMDADLVFDVRF LPNPNYVVDLRPLTGLDKDVNYVM
-----
KWKETEIFFEKLTDLLDFMIPGYKKEGKSQLVIAIGCTGGQHRSVLAERLGNLNEVFEYNVYVHHRDAHIESG
-----
+++++-----+-----++++
EK
--
```

>StrPyo\_Sp.

```
MSDKHINLVIVTGMMSGAGKTVAIQSFEDLGYFTIDNMP PALVPKFLELIEQTNENRRVALVVDMSRSLFFKEINS
-----
TLDSIESNPSIDFWILFLDATDGLVSR YKETRRSHPLAADGRVLDGIRLERELLSPLKSMQHVVDTTKLTFRQ
-----
LRKTI SDQFSEGSNQASFR IEVMSFGFKYGLPLDADLVFDVRF LPNPNYVVELREKTGLDEDVFNVM SHPESEV
-----
FYKHLNLI VPI LPAYQKEGKSVLTVAGCTGGQHRSVAF AHCLAESLATDWSVNESHRDQNRK ETVNRS
-----
+++++-----+-----++++
```

>VibCho\_VC2532

```
MRLIVVSGQSGAGKSVALRVLEDLGYCYVDNLPVSLTAFIQSVQSQQNVAVSI DRNLPKEPSLVQDVLDQLK
-----
QNNDVSMFLDASKETLLKRYSETRRIHPLSLSQSKPSLAQAI ELEKQLLGPLKEQADLLDSSNQSLHELSETV
-----
RMRIEGREKDLVMVFQSFQFKYGLPTDADYVFDVRF LPNPHWEPDLRPLTGLDAP IKSFLEGHSEVMELKQQIQ
-----
KFFEYWLPMLEKNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYLTQQLGEYFAQLGHQVQLRHRTSLEKQQS
-----
+++++-----+-----++++
```

>YerBer\_ZP\_00821539

Optimal Predictions

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLANTLAGRNISAAVSI DVRNMPESPEVFEHAMTQLP
-----
DSFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSAKNLSLESAIDEE SILLEPLRSRADLIVDTSEMSVHELAEMLR
T-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRF LPNPHWDPKLRPMTGLDKPVISFLDRHTEVHNFIYQTRSY
-----
LEQWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQ LADYFRARGKNVQSRHRTLEKRKQ
-----
+++++-----+-----++++
```

## Anhang

>YerEnt\_ZP\_00834134

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLASTLADRNI SAAVSIDVRNMPESPEVFEHAMTQLP
-----
DSFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSTKNLSLESAIDEEEDLLEPLRSRADLI IDTSEMSVHELAEMLR
-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRFPLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVISFLDRHTEVHNFYQTRSY
-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQLADYFRARGKNVQSRHRTLEKRK
-----
+++++-----+-----+
```

>YerFre\_ZP\_00828963

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLASTLAERNISAAVSIDVRNMPESPEVFEHAMTQLP
-----
DSFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSTKNLSLESAIDEEESVLEPLRSRADLI IDTSEMSVHELAEMLR
-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRFPLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVISFLDRHTEVHNFVYQTRSY
-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQLADYFRARGKNVQSRHRTLEKRK
-----
+++++-----+-----+
```

>YerMol\_ZP\_00827279

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLASTLADRNI SAAVSIDVRNMPESPEVFEHAMTQLP
-----
DSFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSTKNLSLESAIDEEEDLLEPLRSRADLI IDTSEMSVHELAEMLR
-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRFPLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVISFLDRHTEVHNFVYQTRSY
-----
LELWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQLADYFRARGKNVQSRHRTLEKRKQ
-----
+++++-----+-----+
```

>YerPes\_Sp.

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLASTLADRNI SAAVSIDVRNMPESPEVFEHAMTQLP
-----
DSFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSAKNLSLESAIDEEEDLLEPLRSRADLI IDTSEMSVHELAEMLR
-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRFPLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVISFLDRHTEVHNFYQTRSY
-----
LEQWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQLADYFRARGKNVQSRHRTLEKRKQ
-----
+++++-----+-----+
```

>YerPse\_YPTB3529

```
MVLMIVSGRSGSGKSVALRALEDMGFYCVDNLPVLLPQLASTLADRNI SAAVSIDVRNMPESPEVFEHAMTQLP
-----
DSFSPQLLFLDADRNTLIRRYSDTRRLHPLSAKNLSLESAIDEEEDLLEPLRSRADLI IDTSEMSVHELAEMLR
-----
RLLGKRERELTMVFESFGFKHGIPIDADYVFDVRFPLPNPHWDPKLRPMTGLDKPVISFLDRHTEVHNFYQTRSY
-----
LEQWLPMLETNNRSYLTVAIGCTGGKHRSVYVAEQLADYFRARGKNVQSRHRTLEKRKQ
-----
+++++-----+-----+
```

>ZymMob\_ZM01325

```
MSRNDLSSAPSSAAPPARILLVTGLSGAGKSTALRTFEDMGWETVDNLP LSLLELRLILTPSSVAAYKGRPLAL
-----
GIDSRTRGFTVDAFLKGVQLRQHHSQPIDILFLDCSDSELMRFD TTRRRHPLALDRPMEDGISEERAF LAPVR
-----
EIA DFLIDTTTTSSHLSQSELRQQFAPENSVAPNVSI LSPGFSRGI PRNCDLLFDMRFLQNPYWEALRPLTGLD
-----
PEIADYIEQDPSFLPAVTKIKDLLLFLPRYIDTGKSYIVIAFACTGGRHRSVYVAEWIAARLRQAHSFLTITHR
-----
DLKLP LLESQSNRIRAGKAYQGG
-----
+++++-----+-----+
```

### 7.7. Rohdaten der MicroArray Analyse

Sequence ID	Venn	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Sequence Code
1555628	IX	3,84	9,07E-08	922	4023	85,01	0	211	20618	ibpA
1555629	IX	4,28	0,00021	721	3757	61,11	4,27E-41	273	21284	ibpB
1554953	III	-1,29	0,11263	7312	5185	25,82	0	633	16024	pyrB
1554960	III	-1,21	0,12283	1848	1437	20,20	0	192	4019	pyrI
1555678	IX	8,93	7,76E-32	2139	21832	12,25	0	5493	66905	glmS
1556250	III	-1,01	0,94071	12093	13800	11,90	1,40E-45	2056	25427	carA
1555315	III	1,57	0,00184	951	1623	11,69	0	1142	13522	mopA
1555572	III	2,17	0,00864	1340	3985	10,88	4,33E-35	1925	22435	hslV
1555911	III	1,50	0,05055	529	695	10,08	0	376	3795	dnaK
1552813	III	1,46	0,29162	407	787	10,01	4,71E-16	513	5871	yrfG
1555316	III	2,18	0,00003	12845	32637	9,33	0	7263	67957	mopB

## Anhang

1554517	III	1,25	0,05212	10279	12072	8,67	0	6846	58528	tnaA
1554518	III	-1,03	0,7082	1020	991	7,67	0	343	2715	tnaB
1554961	III	1,30	0,15827	827	1239	7,45	3,48E-26	889	7032	pyrL
1554501	IX	6,22	8,14E-30	356	2315	7,18	2,19E-35	297	2120	thiG
1555272	III	-1,18	0,04639	338	287	7,12	1,62E-41	240	1698	mglA
1555273	III	1,09	0,42777	777	891	7,09	0	1069	7716	mglB
1555274	III	1,16	0,46541	145	162	6,86	0	132	953	mglC
1552814	III	1,75	0,01413	1443	2988	6,81	0	1347	9167	yrfH
1555684	III	1,16	0,28457	2489	2931	6,55	0	617	4049	glnG
1556106	IX	3,94	9,38E-06	272	1449	6,45	1,09E-27	615	3807	cysH
1557026	III	1,03	0,84607	2714	2662	6,36	5,34E-18	796	5122	ampD
1556197	III	1,72	4,57E-07	2688	4613	6,30	0	972	6241	b4140
1555910	III	-1,08	0,89756	294	225	6,12	0,00009	212	1197	dnaJ
1553230	III	-1,41	0,00612	780	553	6,05	1,87E-21	102	625	yjaB
1552991	III	1,17	0,42472	134	159	5,86	1,57E-30	126	771	yjcH
1555571	III	1,59	0,06901	159	278	5,75	3,15E-18	187	1135	hslU
1553509	IX	4,78	2,26E-11	398	1981	5,41	2,42E-15	321	1648	yhdY
1555460	IX	2,53	8,42E-07	1081	3218	5,27	8,74E-31	1818	10104	lon
1556248	III	-1,07	0,47832	613	576	5,25	5,84E-15	237	1242	caiF
1555858	III	2,07	0,03109	171	412	5,02	3,06E-17	98	478	frvR
1556298	III	1,02	0,93835	157	164	4,86	6,07E-18	119	588	clpB
1555888	III	-1,33	0,015	410	300	4,68	4,65E-31	263	1234	fumC
1556985	III	-1,06	0,59992	239	231	4,54	1,07E-37	206	954	acs
1554758	IX	4,43	6,53E-25	125	571	4,38	1,28E-28	102	445	rhaS
1556107	III	1,82	0,00004	86	163	4,36	8,83E-25	72	313	cysI
1555504	III	1,29	0,3946	166	251	4,22	5,52E-22	128	542	mcrC
1555139	III	-1,01	0,98257	5339	3791	4,07	6,38E-08	6307	24608	ndk
1553071	III	1,36	0,05631	748	989	4,05	0	237	981	yjhH
1556086	III	1,12	0,61925	238	274	4,03	1,40E-45	211	877	cycA
1554111	III	1,53	0,01378	439	600	4,00	1,05E-41	502	1984	ybeY
1556102	III	3,10	0,01397	128	592	3,90	1,16E-07	332	1368	cysC
1555386	III	1,55	0,00016	506	794	3,79	1,35E-39	241	906	inaA-r
1554955	III	-1,27	0,3314	1473	931	3,77	5,13E-08	781	2814	pyrD
1552990	III	1,13	0,5085	152	169	3,63	4,58E-27	141	509	yjcG
1554460	III	-1,11	0,62547	3396	2634	3,59	1,63E-10	3447	12333	sucC
1556218	III	1,47	0,12888	372	505	3,54	0	244	870	bglF
1552815	III	1,32	0,20591	170	232	3,53	1,37E-11	231	834	yrfl
1555250	III	1,78	0,00337	399	669	3,48	2,48E-21	428	1532	menA
1554112	III	1,37	0,3048	200	247	3,45	7,13E-18	303	1000	ybeZ
1553798	III	1,20	0,26154	423	506	3,40	1,04E-28	278	949	ycjX
1555009	III	-1,10	0,75775	637	451	3,37	6,23E-16	931	3054	oppA
1554339	III	-1,26	0,01932	921	727	3,37	1,02E-10	597	2107	upp
1555685	III	1,18	0,18521	579	655	3,34	2,48E-35	1146	3947	glnH
1553184	III	2,48	0,00021	333	836	3,29	5,52E-16	314	1039	yigU
1554319	III	-1,03	0,76799	2750	2731	3,25	4,65E-18	2263	7386	udhA
1556070	III	1,13	0,24774	9060	10099	3,25	6,25E-37	7577	24685	cspE
1553892	III	1,09	0,52364	1250	1386	3,25	9,74E-13	701	2314	yeaD
1553988	III	1,78	0,0076	1098	2383	3,19	4,28E-14	1454	4875	yceP
1556347	III	1,38	0,00037	961	1302	3,12	8,58E-23	1355	4331	b2531
1555744	III	1,22	0,56782	210	309	3,12	1,06E-09	233	755	grpE
1556874	III	1,55	0,00005	374	568	3,11	1,07E-16	633	2026	artP
1556193	III	-1,56	0,0001	513	339	3,08	1,22E-21	341	1075	b3913
1556108	IX	1,91	1,66E-09	211	394	3,06	6,72E-06	432	1254	cysJ
1555240	III	-1,15	0,56325	2254	1608	3,06	6,27E-08	2872	8646	mdh
1555576	III	1,47	0,02941	368	492	3,00	2,53E-25	636	1936	htrA
1555505	III	-1,23	0,01905	382	311	2,99	2,72E-23	141	421	mcrD
1554435	III	1,06	0,78046	3194	3505	2,98	1,09E-18	1178	3529	yadD
1557015	III	1,02	0,8296	564	559	2,97	1,79E-32	533	1593	aldA
1555909	III	1,37	0,06073	1000	1514	2,96	2,26E-23	1297	3851	dnaG
1554070	III	1,67	0,21751	4129	11552	2,94	0,00021	9209	29815	ybcU
1555263	III	2,22	0,03016	80	197	2,94	9,44E-17	103	303	metF
1556194	III	1,06	0,87553	1236	1896	2,92	0,00012	1636	5176	b3914
1555241	III	-1,13	0,4899	1848	1401	2,92	4,04E-07	2990	8481	mdh-r
1556987	III	1,05	0,79163	351	406	2,90	2,79E-11	409	1202	add



## Anhang

1553148	III	1,32	0,0378	327	420	2,87	1,93E-10	180	510	yidY
1555287	III	1,20	0,1141	4920	5611	2,87	1,09E-06	5819	15967	miaA
1553958	III	1,56	0,04539	2789	5284	2,87	4,07E-12	3971	11764	yccV
1553731	III	1,45	0,01552	98	145	2,85	0,0001	124	377	yeiC
1556779	III	-1,03	0,78803	490	479	2,84	1,78E-19	168	463	b1397
1555432	III	1,86	0,01504	105	217	2,80	0,00001	239	721	ldhA
1553285	III	-1,11	0,72937	1206	891	2,79	0,00051	2011	5471	yhgl
1556045	III	-1,23	0,18131	304	264	2,78	1,39E-17	308	871	corA
1554340	III	1,00	0,97713	420	423	2,76	9,34E-06	403	1171	uraA
1553201	III	1,28	0,28732	245	342	2,76	1,15E-31	130	354	yihR
1554950	III	-1,34	0,38496	155	126	2,76	1,49E-06	110	285	putP
1555086	III	1,35	0,12484	364	475	2,75	1,43E-18	135	371	phnO
1553165	III	-1,32	0,13897	893	598	2,74	2,43E-29	387	1066	yifE
1553097	III	1,22	0,14896	567	683	2,59	1,36E-07	318	814	yjiU
1554110	III	1,76	0,01476	176	283	2,58	5,97E-11	289	718	ybeX
1554484	III	1,27	0,424	208	254	2,52	6,44E-09	287	738	tdcD
1554956	III	1,13	0,60999	159	182	2,50	8,80E-06	143	379	pyrE
1555164	III	1,10	0,54283	1097	1069	2,50	3,24E-19	3036	7518	nmpC
1555689	III	1,04	0,85109	506	491	2,47	9,68E-13	701	1735	glnQ
1555503	III	1,11	0,70274	304	407	2,44	4,75E-08	510	1307	mcrB
1555401	III	1,01	0,9639	888	865	2,43	3,44E-07	706	1587	ivbL
1554628	III	1,28	0,43954	188	237	2,37	0,00003	163	387	sbp
1553096	III	1,27	0,44327	166	258	2,35	9,79E-08	325	781	yjiT
1555010	III	1,05	0,6125	267	275	2,35	1,83E-24	584	1373	oppB
1553540	III	1,48	0,06255	579	1005	2,34	2,16E-17	2052	4809	yfhO
1554705	III	1,23	0,15144	3500	4756	2,34	1,39E-12	4709	11299	speE
1553431	III	1,08	0,50168	561	617	2,33	2,82E-22	227	535	ygiO
1555869	III	1,22	0,03481	436	536	2,32	8,03E-12	530	1267	ftsJ
1555886	III	-1,04	0,81886	498	514	2,32	8,88E-20	694	1642	fumA
1555483	III	-1,26	0,15092	207	168	2,31	7,73E-11	177	411	malK
1555859	III	1,49	0,05403	396	574	2,28	6,82E-06	216	502	frvX
1555774	III	1,43	0,00939	310	432	2,28	3,71E-06	175	390	fimC
1554954	III	1,05	0,84566	438	370	2,27	2,56E-15	525	1175	pyrC
1556787	III	-1,09	0,5495	531	526	2,26	0,00001	377	888	b1422
1553501	III	1,29	0,09676	277	375	2,25	1,10E-09	373	867	yhdN
1554540	III	-1,07	0,60663	1497	1333	2,25	5,30E-09	5365	12146	treC
1552853	III	1,25	0,33845	962	931	2,25	3,26E-07	836	1905	ykfE
1555088	III	1,21	0,37185	332	391	2,22	1,69E-06	145	325	phnQ
1554040	III	-1,31	0,04427	797	617	2,20	1,41E-08	334	762	yciH
1555276	III	1,12	0,66272	321	420	2,20	5,97E-10	427	946	mgtA
1554457	III	1,05	0,66373	355	376	2,19	5,15E-08	197	439	stpA
1556872	III	1,16	0,12701	757	872	2,19	5,52E-09	1038	2330	artI
1554770	III	1,14	0,51918	510	671	2,18	2,73E-16	1454	3198	ribB
1556233	III	1,30	0,32665	1381	1752	2,17	1,04E-06	805	1753	brnQ
1555688	III	1,29	0,23277	204	242	2,16	3,23E-15	479	1065	glnP
1553114	III	-1,05	0,65424	669	618	2,15	3,54E-20	880	1915	yibN
1554459	III	-1,01	0,98015	2300	1851	2,13	3,44E-10	4629	9785	sucB
1553747	III	1,25	0,12593	300	385	2,09	8,82E-09	232	474	yejF
1555666	III	-1,07	0,48868	382	355	2,04	2,16E-07	430	899	glcF
1555597	III	-1,21	0,12081	186	154	2,02	2,09E-07	152	308	hycA
1555070	III	-1,45	0,00053	3655	2509	2,02	2,14E-11	1005	2043	pheP
1556116	III	1,12	0,63185	176	206	2,00	4,63E-13	299	600	cysW
1555830	III	1,31	0,15955	333	473	1,96	1,63E-13	596	1176	fliY
1554859	III	-1,50	0,00003	1810	1202	1,95	3,12E-16	610	1191	potG
1556883	III	-1,43	0,01191	342	232	1,93	8,33E-15	409	793	asnA
1555979	III	1,13	0,53141	115	129	1,91	1,22E-07	133	249	exbB
1555707	III	-1,10	0,28842	3030	2749	1,85	4,04E-13	5668	10740	gltA
1556944	I	2,49	2,15E-10	128	302	1,69	6,02E-07	342	574	b0831
1555773	IV	-1,03	0,8888	220	219	-1,87	1,36E-11	783	417	hemA
1555321	IV	-1,15	0,23529	1046	903	-1,89	2,76E-14	2983	1596	mrcB
1553108	IV	-1,18	0,2649	434	364	-1,89	8,99E-11	767	408	yjiN
1553027	IV	-1,01	0,94739	158	159	-1,90	9,45E-15	879	463	yjeR
1554362	IV	-1,31	0,07979	554	386	-1,91	2,10E-10	2389	1239	wbbI
1554940	IV	-1,24	0,37575	141	120	-1,94	4,81E-09	356	183	purF

## Anhang

1552810	IV	1,16	0,40898	576	629	-2,02	6,23E-10	1294	632	yrfD
1554814	IV	-1,31	0,02045	567	428	-2,02	1,81E-16	2700	1336	rplQ
1554965	IV	-1,16	0,33782	775	721	-2,08	1,40E-08	5112	2439	radC
1553489	IV	-1,14	0,49355	328	296	-2,10	1,32E-16	781	369	yhcN
1554450	IV	1,06	0,82895	250	319	-2,12	3,18E-07	1898	909	srlR
1553040	IV	1,01	0,93918	188	197	-2,12	9,41E-17	908	428	yjfN
1553756	IV	-1,00	0,98479	103	103	-2,17	1,91E-13	352	163	yfaE
1555008	IV	-1,10	0,69427	466	386	-2,18	2,64E-17	2337	1056	ompX
1556143	IV	-1,08	0,63856	173	161	-2,18	1,30E-08	455	207	deaD
1555138	IV	-1,16	0,63849	150	124	-2,21	3,41E-06	673	301	ndh
1554605	IV	1,05	0,85839	143	160	-2,26	0,00002	573	255	rstB
1557011	IV	1,31	0,30492	214	243	-2,26	1,37E-06	1458	635	ahpF
1556448	IV	-1,08	0,48388	141	127	-2,28	2,84E-10	681	295	b1837
1555358	IV	1,23	0,56793	122	119	-2,28	4,65E-06	538	230	mvnN
1554363	IV	-1,31	0,02318	468	339	-2,30	2,03E-11	3989	1729	wbbJ
1554595	IV	-1,74	0,00002	2287	1365	-2,36	3,55E-09	15862	7025	rpsS
1556889	IV	1,05	0,79922	184	199	-2,38	6,95E-14	721	305	aspS
1554808	IV	-1,12	0,47793	2926	2370	-2,40	3,81E-07	25279	10019	rplL
1554566	IV	-1,48	0,28973	398	252	-2,42	0,00008	1921	714	tsf
1554820	X	<b>-1,99</b>	<b>1,37E-09</b>	<b>1797</b>	<b>873</b>	-2,46	3,02E-20	10730	4441	rplV
1554847	IV	-2,05	0,00271	1788	768	-2,50	9,24E-08	5695	2290	rpsC
1552841	IV	-1,11	0,50174	628	572	-2,52	3,88E-07	1770	718	yjiP
1553194	IV	-1,12	0,53849	1602	1653	-2,53	1,47E-09	11898	4809	yihK
1555167	IV	-1,01	0,95992	181	187	-2,56	5,40E-06	962	375	nrda
1556989	IV	-1,08	0,74196	275	281	-2,57	2,66E-10	2275	902	adhE
1554422	IV	1,00	0,98809	259	262	-2,57	5,77E-06	758	297	yabO
1554617	IV	1,10	0,74523	131	140	-2,61	1,42E-07	934	354	sapA
1555255	IV	1,12	0,62822	184	217	-2,63	2,61E-08	1131	442	menF
1552948	IV	-1,08	0,62186	186	179	-2,65	5,71E-11	755	283	yojL
1555183	IV	-1,02	0,86822	213	212	-2,66	2,45E-15	1299	478	ntpA
1554615	IV	-1,04	0,74295	177	170	-2,67	4,31E-24	435	162	ruvC
1555109	IV	-1,07	0,75344	276	295	-2,74	2,03E-16	2081	751	pmrD
1554012	IV	1,78	0,00001	135	243	-2,80	1,93E-24	986	354	ycgE
1553443	IV	-1,04	0,82107	287	265	-2,84	2,33E-21	691	243	yhaG
1554744	IV	-1,52	0,00028	402	270	-2,86	1,93E-19	1180	412	rfaY
1554440	IV	1,25	0,51168	160	184	-2,96	3,27E-10	772	262	yadI
1554027	IV	1,05	0,80371	124	130	-2,99	5,61E-22	982	333	ychH
1555249	IV	1,48	0,26999	113	155	-3,15	2,08E-07	907	302	melR
1554364	IV	-1,01	0,96367	654	720	-3,19	5,37E-29	6620	2081	wbbK
1554935	IV	-1,44	0,00035	408	279	-3,19	1,30E-09	2686	806	purA
1553809	IV	1,37	0,45718	268	453	-3,22	2,13E-07	2487	812	ydaR
1556476	IV	-2,05	0,00146	209	99	-3,25	3,14E-18	392	122	b2001
1554745	IV	-1,11	0,5115	181	165	-3,38	6,53E-22	1293	387	rfaZ
1553455	IV	-1,05	0,8154	109	108	-3,45	4,26E-31	561	164	yhaU
1556971	IV	-1,06	0,85561	388	322	-3,47	1,08E-11	3220	916	aceF
1553442	IV	1,13	0,71801	109	113	-3,56	1,94E-22	991	276	yhaF
1553463	IV	-1,07	0,74854	1280	1478	-3,63	4,94E-41	14953	4152	yhbM
1555519	IV	1,05	0,8487	216	230	-3,68	1,23E-06	1146	285	hepA
1554481	IV	-1,34	0,30019	102	83	-3,98	4,74E-06	485	112	tdcA
1554739	IV	-1,27	0,49882	513	515	-4,74	6,11E-07	4355	994	rfaK
1553461	X	<b>-2,36</b>	<b>0,00086</b>	<b>247</b>	<b>102</b>	-8,28	0	923	108	yhbJ
1556067	IV	1,12	0,63171	1117	1552	-15,31	0	44565	2964	cspA



## Curriculum Vitae

---

Name: Kalamorz, Falk  
Geburtsdatum: 06.02.1981  
Geburtsort: Bad Lauterberg  
Nationalität: Deutsch

### Bildung und berufliche Laufbahn:

1987-1991	Grundschule Bad Lauterberg
1991-1993	Orientierungsstufe der Kooperative Gesamtschule Bad Lauterberg
1993-1997	Gymnasialzweig an der Kooperative Gesamtschule Bad Lauterberg
1997-2000	Sekundarstufe 2 am Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium Herzberg/Harz, Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife
2000-2005	Studium der Biologie (Diplom) an der Georg-August-Universität Göttingen
2005	Abschluß mit Diplom
2006-bis heute	Dktorarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen