

**Katabolitrepression durch Nicht-PTS
Kohlenstoffquellen in *Escherichia coli* am Beispiel
des Glycerineffekts**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
an der Universität Konstanz

Mathematisch-naturwissenschaftliche Sektion
Fakultät für Biologie

vorgelegt von
Tanja Eppler

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2001

Referent: Prof. Dr. Boos

Referent: Prof Dr. Malchow

Danksagung:

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. W. Boos für die Ermöglichung meine Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen und für seine unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft. Er stand mir oft mit Rat, Tat und Humor zur Seite.

Danke an Prof. Dr. Malchow dafür, dass er sich als mein Zweitgutachter zur Verfügung gestellt hat.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Boos möchte ich mich bedanken, dass sie mich in ihren Reihen aufgenommen haben. Ganz besonders Reinhold Horlacher, Ralf Peist, Gerhard Greller, Marina Kossmann, Renate Riek, Günter Kramer, Anja Schlegel und allen anderen „M1048ern“ gebührt Dank für die nette Zusammenarbeit, fruchtbaren Diskussionen und tatkräftige Unterstützung; danke, Pari, für so manche Überstunde, die Du über Veröffentlichungen sitzen mußtest.

Nach Amsterdam zu Dr. Pieter Postma und Rechien Bader und nach Marburg an Dr. Uwe Völker schicke ich ein Danke schön für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Und „last but not least“ bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, bei Thomas und Jürgen für die tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen.

We seek to find nature one, a coherent unity. This gives to scientists their sense of mission, and let us acknowledge it, their aesthetic fulfillment: that every research carries the sense of drawing together the threads of world into patterned web.

Jacob Bronowski

Inhaltsverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Das Maltosesystem	1
1.3 Die Regulation des Maltoseregulons	4
1.3.1 MalT und cAMP/CRP- positive Regulatoren des Maltosesystems	4
1.3.2 Die Regulation der <i>malT</i> Expression	5
1.3.3 Die Rolle von MalK bei der Regulation des Maltosesystems	7
1.3.4 Die Regulation des Maltosesystems durch MalY und Aes	8
1.3.5 Die exo- und endogene Induktion	9
1.4 Das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferasesystem	10
1.5 Der cAMP/ CRP- Komplex als globaler Regulator	11
1.6 Die Anfänge der Erforschung der Katabolitrepression	12
1.7 Die Regulation des Stoffwechsels durch das Glucose PTS	14
1.7.1 „Inducer Exclusion“	14
1.7.2. Die Regulation der Adenylatcyclase durch Enzym IIA ^{Glc}	16
1.8 Die Frage nach der Allgemeingültigkeit des klassischen Modells	17
1.9 Vorarbeit und Zielsetzung der vorliegenden Promotionsarbeit	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Abkürzungen	21
2.3 Verwendete Bakterienstämme, Phagen und Plasmide	22
2.4 Mikrobiologische Methoden	24
2.4.1 Medien	24
2.4.2 Kohlenstoffquellen und andere Medienzusätze	25
2.4.3 Kulturbedingungen	26
2.4.4 Zelldichtemessung	26
2.5 Genetische und molekularbiologische Methoden	27
2.5.1 Grundlegende Techniken mit Nukleinsäuren	27

2.5.2 Stammkonstruktionen	27
2.5.3 <i>In vivo</i> - Isolierung Mini Tn10-Insertionen	27
2.5.4 Inverse PCR	28
2.5.5 Plasmidkonstruktionen	29
2.6 Biochemische Methoden	29
2.6.1 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese	29
2.6.2. Western Blot	29
2.6.3 CRP-Reinigung	30
2.6.4 Antikörperreinigung nach der Immunoblotting Technik nach Olmsted (1981)	31
2.6.5 Herstellung von Zellextrakten für 2D-Gelelektrophorese Analysen	31
2.6.6 Determination des Phosphorylierungsgrads von Enzym IIA ^{Glc}	31
2.6.7 Fluoreszenzphotospektroskopie	32
2.6.8 β - Galaktosidase Assays von <i>lacZ</i> Fusionsstämmen	32
3. Ergebnisse	34
3.1 Die zwei verschiedenen Ebenen der <i>malt</i> Regulation	34
3.1.1 Vergleich transkriptionaler und translationaler <i>malt-lacZ</i> bzw. <i>malk-lacZ</i> Fusionen hinsichtlich der Rolle von Enzym IIA ^{Glc} beim Glycerineffekt	34
3.1.2 Die Rolle der Adenylatcyclase	35
3.2 Untersuchungen zur transkriptionalen Regulationsebene	37
3.2.1 CRP ist nicht das direkte Ziel von G3P	37
3.2.2 Die Repression ist unabhängig von der CRP-Menge in der Zelle	38
3.2.3 CRP ist essentiell für die transkriptionale Repression	42
3.2.4 Der Phosphorylierungsstatus von EIIA ^{Glc} in Anwesenheit von Glycerin	44
3.2.5 Ist die Glycerin-abhängige Repression bedingt durch eine Titration von EIIA ^{Glc} durch die Glycerinkinase GlpK?	46
3.2.6 Der Einfluss von G3P auf die Regulation der Adenylatcyclaseaktivität	49
3.3 Die posttranskriptionale Regulationsebene	50

3.3.1 Die Stabilität von MalT bleibt unbeeinflusst in Gegenwart von Glycerin	50
3.3.2 Isolierung und Charakterisierung von Mutanten, die durch Glycerin nicht mehr reprimiert werden	52
3.3.2.1 Vorversuche	52
3.3.2.2 Versuch zur Aufklärung der posttranskriptionalen Regulation	53
3.3.2.3 Charakterisierung der Klone	54
3.3.2.4 Klonierung und Sequenzierung der Mini-Tn10::Cam Insertionen	56
3.3.3 Weitere Charakterisierung der <i>purK</i> Mutante	57
3.3.3.1. Untersuchungen zum Phänotyp der <i>purK</i> Mutante	57
3.3.3.2 Die PurK Überproduktion oder Puringabe können den <i>purK</i> Effekt aufheben	57
3.3.3.3 Die <i>purK</i> Mutation verursacht einen stabilen pH-Wert des Mediums	59
3.3.3.4 Sind Alarmone der Grund der Repression?	60
3.3.3.5 Ist das verlangsamte Wachstum die Ursache des Phänomens?	61
3.3.4 Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der posttranskriptionalen Repression	62
3.4 Der Einfluss von Glycerin auf das Muster der synthetisierten Proteine der Zelle	64
3.5 Katabolitrepression durch andere Nicht-PTS Zucker	68
3.5.1 Untersuchung zur Repression einiger Nicht-PTS Zucker	68
3.5.2 Isolierung und Charakterisierung einer Insertionsmutante, die durch Xylose nicht mehr reprimierbar ist	69
3.5.3 Untersuchung von Galaktosemutanten	70
3.5.4 Untersuchungen zur Repression durch Glucose-6-Phosphat	71
4. Diskussion	74
4.1 Der Einfluss von Glycerin auf das Maltosesystem	74
4.2 Die Rolle des cAMP/CRP-Komplexes	77
4.3 Wie wirkt G3P auf die beteiligten Komponenten?	80

4.3.1 Die Dephosphorylierung von EIIA ^{Glc} -P ist nicht der Grund der Repression durch G3P	81
4.3.2 Die Hemmung der Interaktion zwischen EIIA ^{Glc} -P und der Adenylatcyclase	82
4.4 Der Charakter der posttranskriptionalen Regulation	84
4.4.1 Die translationale Regulation ist pH-abhängig, jedoch unabhängig von cAMP und EIIA ^{Glc}	84
4.4.2 Die Verhinderung einer posttranskriptionalen Repression durch die verschiedensten Mutationen	86
4.4.3 Welche Rolle haben die Purine?	88
4.4.4 Der mögliche Grund für die Stabilisierung des pHs in Purinmutanten	90
4.5 Die Auswirkungen von Nicht-PTS Kohlenstoffquellen auf die Zelle	92
4.5.1 Die pleiotrophe Regulation durch Nicht-PTS Kohlenstoffe	92
4.5.2 Die Rolle der phosphorylierten Kohlenstoffe	94
4.6 Ein mögliches Modell für die Katabolitrepression durch Nicht-PTS Kohlenstoffquellen	97
5. Zusammenfassung	100
6. Literaturverzeichnis	103

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1 : Regulation und genetische Organisation des Maltoseregulons in <i>E. coli</i>	6
Abbildung 2 : Einfluss des PTS auf die Adenylatcyclase und „Inducer Exclusion“	15
Abbildung 3 : Die Fluoreszenz der Tryptophanreste von CRP als Funktion der cAMP-Konzentration	38
Abbildung 4 : Einfluss der CRP-Menge auf den Glycerineffekt	39
Abbildung 5 : Lokalisierung des 34kD-Proteins	41

Abbildung 6: Determination des Phosphorylierungszustands von EIIA ^{Glc} in Anwesenheit von Glycerin bzw. G3P	45
Abbildung 7 : Zeitabhängige Dephosphorylierung von EIIA ^{Glc} -P	46
Abbildung 8: Expression einer <i>malt-lacZ</i> Fusion nach Hemmung der Proteinbiosynthese	51
Abbildung 9: Auswirkungen einer <i>purK</i> Mutation auf die Wachstumskurve	62
Abbildung 10: Der Glycerineinfluss auf das Gesamtproteinbild der Zelle	65/ 66
Abbildung 11: Mögliches Modell der Katabolitrepression durch Nicht-PTS Kohlenstoffquellen	98

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Bakterienstämme	22
Tabelle 2: Phagen	23
Tabelle 3: Plasmide	23
Tabelle 4: Kohlenstoffquellen und andere Medienzusätze	25
Tabelle 5: Der Einfluss von Glycerin auf Δcrp Mutanten	35
Tabelle 6: Der Einfluss einer $\Delta cya crp^*$ Mutation auf die Expression von <i>malt-lacZ</i> Fusionen	36
Tabelle 7: Die Expression einer cAMP/CRP-unabhängigen <i>malt-lacZ</i> -Fusion in Anwesenheit verschiedener Zucker	43
Tabelle 8: Spezifische β -Galaktosidase Aktivitäten von Glycerinstoffwechselmutanten	47
Tabelle 9: Einfluss der Überexpression von EIIA ^{Glc} auf den Glycerineffekt	48
Tabelle 10: Rolle der regulatorischen Domäne der Adenylatcyclase beim Glycerineffekt	50
Tabelle 11: Spezifische β -Galaktosidase Aktivität der Insertionsmutanten in An- und Abwesenheit von Glycerin	54
Tabelle 12: Charakterisierung der Insertionsmutanten	55

Tabelle 13: Einfluss von Guanosin auf den Phänotyp einer <i>purK</i> Mutante	58
Tabelle 14: Komplementation der <i>purK</i> Mutation durch PurK Überproduktion	58
Tabelle 15: Die Auswirkungen von Guanosin auf die <i>purK</i> Mutanten ET130 in gepuffertem Medium	59
Tabelle 16: Auswirkungen von Guanosin auf den pH im Medium verschiedener Übernachtskulturen	60
Tabelle 17: Untersuchung zur Rolle von AppppA	61
Tabelle 18: Spezifische β - Galaktosidase Aktivität transkriptionaler bzw. translationaler <i>malT-lacZ</i> Fusionen in verschiedenen Medien	63
Tabelle 19: Einfluss des externen pH-Werts auf translationale <i>malT-lacZ</i> Fusionen	64
Tabelle 20: Überblick über eine Auswahl an Glycerin-reprimierten Genen	67
Tabelle 21: Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen auf eine translationale <i>malK⁺-lacZ</i> Fusion	68
Tabelle 22: Einfluss der unbekanntenen Tn10-Insertion auf die Repression durch Xylose	70
Tabelle 23: Der Einfluss von Galaktose auf einige Mutanten des Galaktosestoffwechsels	71
Tabelle 24: Einfluss einer <i>pgi</i> Mutation auf die Repression durch Glucose-6-Phosphat	72
Tabelle 25: Die Rolle von EIIA ^{Glc} bei der Glucose-6-Phosphat, Gluconat, Xylose und Galaktose vermittelten Repression	73

1. Einleitung

1.1 Einführung

Bakterien entwickelten im Laufe der Evolution eine erstaunliche Vielfalt an verschiedenen metabolen Systemen. Sie können eine Vielzahl an Kohlenstoffquellen verwerten und passen sich schnell an wechselnde Bedingungen in ihrer Umwelt an. Dies ist besonders wichtig, wenn man bedenkt, dass sie immer mit anderen Organismen um die begrenzten Ressourcen in Konkurrenz treten müssen. Es erfordert ein gutes Signaltransduktions- und Regulationsnetzwerk. Sie müssen vorhandene Kohlenstoffquellen erkennen und schnell und effektiv darauf reagieren, daher werden benötigte metabolische Systeme induziert und andere reprimiert. Ein Ziel der heutigen Forschung ist es, die Vielfalt an Regulationssystemen, deren komplexe Natur, ihre Interaktionen und ihre molekulare Kontrolle zu verstehen.

Das begeißelte Bakterium *Escherichia coli* gehört zu den am besten untersuchten Organismen überhaupt. Das primäre Habitat dieses Gram-negativen Stäbchens ist der Darm von Säugern und Vögeln, daher ist es zu den Enterobakterien (*Enterobacteriaceae*) zu zählen. Da an diesem Organismus schon viele allgemeine Modelle genetischer und biochemischer Mechanismen aufgestellt werden konnten, besitzt er einen wichtigen Stellenwert in der modernen Mikrobiologie. So z.B. auch bei der Erforschung der Regulation von zuckerverwertenden Systemen wie dem Maltosesystem.

1.2 Das Maltosesystem

Das Maltosesystem von *E. coli* wird für die Verwertung von Maltose und Maltodextrin benötigt. Es besteht aus einer Anzahl an Genen, deren Produkte für die Aufnahme und den Metabolismus dieser Kohlenhydrate verantwortlich sind. Alle diese Gene stehen unter der Kontrolle des transkriptionalen Aktivators MalT (Hatfield et al., 1969a).

Das Maltosetransportsystem gehört zur Familie der bindenproteinabhängigen ABC-Transporter (Übersicht Boos & Lucht, 1996; Boos & Eppler, eingereicht). Das Transportsystem besteht aus dem transmembranösen Komplex, der aus vier Untereinheiten (MalF/G/K₂) aufgebaut ist und zwei weiteren akzessorischen Proteinen (LamB und MalE). Die dazugehörigen Gene sind alle in der *malB*-Region bei 91,5 min auf dem *E. coli* Genom lokalisiert (Schwartz, 1966). Sie sind in zwei transkriptionelle Einheiten (Operone) zusammengefasst, wovon das eine die Gene *malE/F/G* und das

andere *malK/lamB/malM* enthält. Die Transkription erfolgt im ersten Fall gegen den Uhrzeigersinn, im zweiten Fall wird im Uhrzeigersinn abgelesen. So liegen zwei divergente Operone vor, deren Transkriptionsstartpunkte 271bp voneinander getrennt sind (Hofnung, 1974; Raibaud et al., 1979; Silhavy et al., 1979).

Eines der beiden akzessorischen Proteine stellt, die am Transport beteiligte Komponente, LamB dar. Es handelt sich hierbei um ein integrales Aussenmembranprotein, das erstmals als λ -Phagenrezeptor identifiziert wurde (Randall-Hazelbauer & Schwartz, 1973). Das funktionelle Protein besteht aus drei identischen Untereinheiten, die drei mit Wasser gefüllten Poren bilden (Ishii et al., 1981; Palva & Westermann, 1979) und so erleichterte Diffusion von Maltose, Maltodextrinen und anderen Zuckern erlaubt (Freundlieb et al., 1988; Klein & Boos, 1993). An der engsten Stelle der Kanalinnenseite konnte eine Substratbindestelle für Maltodextrine nachgewiesen werden (Schirmer et al., 1995). Das Maltosebindeprotein (MBP oder MalE) wird von *malE* codiert (Kellermann & Szmelcman, 1974) und besteht aus zwei pseudo-symmetrischen Domänen, zwischen denen sich die Substratbindestelle befindet (Spurlino et al., 1991). Mit der Bindung des Substrats im Periplasma geht eine Konformationsänderung einher, welche die Bindestelle für das umgebende Medium unzugänglich macht (Sharff et al., 1992). Das Protein bindet Maltose bzw. Maltodextrine mit hoher Affinität (K_D ca. $1\mu\text{M}$) (Szmelcman et al., 1976; Ferenci et al., 1986) und bringt es zu dem Transportkomplex in der Cytoplasmamembran. Desweiteren interagiert das mit Substrat beladene MBP auch mit dem Chemotaxis-Sensorprotein Tar und ermöglicht so dem Bakterium Chemotaxis auf einen Maltodextringradienten (Koiwai & Hayashi, 1979; Zhang et al., 1992).

Im gleichen Operon wie *malK* und *lamB* wurde ein weiteres Gen, *malM* genannt, identifiziert. Über dessen Funktion im Maltosesystem ist aber bislang noch nichts bekannt.

Der Kanal über die Cytoplasmamembran wird von zwei integralen Proteinen MalF und MalG gebildet (Hengge & Boos, 1983; Shuman et al., 1980, Shuman, 1987; Treptow & Shuman, 1985). Für einen erfolgreichen Transport ins Cytoplasma müssen zwei wichtige Voraussetzungen erfüllt sein: Zum einen müssen beide pseudosymmetrischen Domänen von MBP spezifisch mit MalF und MalG interagieren (Hor & Shuman, 1993). Zum anderen muss ein MalK-Dimer über die beiden Membrankomponenten mit der Innenseite der Cytoplasmamembran assoziiert vorliegen (Davidson & Nikaido, 1991). Das MalK-Protein ist für die Energetisierung des Transports durch ATP-Hydrolyse verantwortlich (Mimmack et al., 1989; Davidson & Nikaido, 1990).

Für den Abbau von Maltodextrinen sind in *E. coli* vier Enzyme beschrieben. Zwei dieser Proteine werden durch das Operon *malP/Q* codiert. Diese transkriptionelle Einheit ist zusammen mit dem Gen für MalT in der *malA*-Region bei 75 min lokalisiert (Hatfield et

al., 1969). Das *malP/Q*-Operon wird divergent zu *malT* transkribiert und die beiden Transkriptionsstartpunkte sind 513 bp voneinander getrennt (Raibaud et al., 1983). Das Produkt von *malQ* ist eine Amylomaltase (Wiesmeyer & Cohn I. + II., 1960). Sie erkennt als kleinstes Substrat Maltotriose. Vom reduzierenden Ende dieses Dreifachzuckers, aber auch von längeren Ketten, spaltet MalQ Glucose ab und hängt das restliche Dextrin an das nicht-reduzierende Ende eines Akzeptors. Als Akzeptor sind schon einzelne Glucosemoleküle geeignet (Palmer et al., 1976). Die dabei entstehenden längeren Glucoseketten können dann als Substrat für das *malP*-Genprodukt, die Maltodextrinphosphorylase (Schinzel & Palm, 1990), dienen. Dieses Enzym überträgt auf die nicht-reduzierenden Enden der Maltooligosaccharide, die mindestens Pentaosen sein müssen, freies anorganisches Phosphat und spaltet dann Glucose-1-Phosphat ab (Schwartz & Hofnung, 1967; Palm et al., 1985). Aus Glucose und Glucose-1-Phosphat entsteht durch die Reaktion zweier Enzyme, die nicht zum Maltoseregulon gehören, Glucose-6-Phosphat, das in die Glykolyse eingehen kann. Dies ist zum einen die Glucokinase (Glc) (Curtis & Epstein, 1975; Meyer et al., 1997) und zum anderen die Phosphoglucomutase (Pgm) (Adhya & Schwartz, 1971).

Zwei weitere Gene, *malS* und *malZ*, die ebenfalls unter der positiven Kontrolle von MalT stehen, wurden außerhalb der *malA*-Region liegend, und zwar bei 80 min und 9 min, auf dem *E. coli* Chromosom identifiziert. Das *malS*-Genprodukt ist im Periplasma lokalisiert. Diese α -Amylase kürzt längere Maltooligosaccharide für den Transport (Freundlieb et al., 1988). Es werden vom nicht-reduzierenden Ende Dextrine, bevorzugt Maltohexaosen, abgetrennt. Ein weiteres Enzym des Maltosesystems ist MalZ, eine cytoplasmatische Maltodextringlucosidase (Reyes et al., 1986; Tapio et al., 1991), die als Substrat Maltodextrine mit Kettenlängen von 3-7 Glucoseresten verwerten kann. Die Reaktion erfolgt am reduzierenden Ende, und es entsteht dabei wiederum Glucose, die in der Glykolyse weiter metabolisiert wird.

Maltose dient für keines der Enzyme als Substrat, sondern kann nur als Akzeptor für die Amylomaltase dienen. Daher können Mutanten in *malQ* nicht auf Maltose wachsen (Pugsley & Dubreuil, 1988). Durch die Akkumulation von Maltose im Innern der Zelle ist das Wachstum dieser Mutanten in Anwesenheit anderer Kohlenstoffquellen stark gehemmt (Hofnung et al., 1971; Szmelcman et al., 1976).

1.3 Die Regulation des Maltoseregulons

1.3.1 MalT und cAMP/CRP-positive Regulatoren des Maltosesystems

MalT ist der Transkriptionsaktivator aller Gene des Maltoseregulons, ausgeschlossen *malT* selbst (Hatfield et al., 1969; Hofnung et al., 1971). Das 103 kDa große Protein besitzt im C-Terminus ein DNA-Bindemotiv, das Homologie zu den Transkriptionsaktivatoren der UhpA/ LuxR Familie zeigt (Cole & Raibaud, 1986; Vidal-Ingigliardi et al., 1993). Mit der Bindung von ATP (K_d 0,4 μ M) und Maltotriose (K_d ~20 μ M) an MalT geht die inaktive Form in eine aktive über (Richtet & Raibaud, 1989; Dardonville & Raibaud, 1990). Doch eine Hydrolyse von ATP ist weder für die DNA-Bindung von MalT noch für die Bildung des offenen Transkriptionskomplexes wichtig, denn auch ADP oder nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga vermitteln eine Aktivierung der Transkription (Richtet & Raibaud, 1989). Gelfiltrationsexperimente zeigten kürzlich, dass MalT in einem Gleichgewicht zwischen einer inaktiven monomeren und einer aktiven oligomeren Form vorliegt (Schreiber & Richtet, 1999). Für die Oligomerisierung des Komplexes, der zwischen drei bis sechs Untereinheiten umfasst, müssen die beiden Effektoren ATP und Maltotriose vorhanden sein. (einen Überblick darüber verschafft Abb. 1)

Charakteristisch für die fünf MalT-abhängigen Promotoren sind sogenannte MalT-Boxen, an die der oligomere Aktivatorkomplex binden kann. Dabei handelt es sich um kurze, asymmetrische Motive mit einer Konsensussequenz, die 5'-ggGGa(G/T)GAgg-3' lautet. Eine Bindestelle ist immer im Bereich von -38bp lokalisiert. Mindestens zwei weitere direkt aufeinander folgende, gleich orientierte MalT-Boxen befinden sich weiter stromaufwärts. Die Orientierung dieser Bindestellen in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt ist nicht festgelegt. Die für viele Promotoren typische -35bp Region fehlt (Raibaud et al., 1989; Vidal-Ingigliardi et al., 1991; Richtet et al., 1991). Die Bindung mehrerer MalT-Proteine an ihre Bindestellen ermöglicht eine Interaktion, die zu einer Veränderung der DNA Topologie führt. Laut Danot & Raibaud (1993) stellt diese Anordnung der MalT-Boxen die Minimalstruktur der cAMP/CRP-unabhängigen Promotoren des *malZ* Gens und des *malP/Q* Operons dar.

Im Gegensatz dazu ist die Expression der Gene der *malB*-Region zusätzlich von cAMP/CRP abhängig (Raibaud et al., 1989). Desweiteren nimmt man an, dass die *malS* Expression außer MalT- auch cAMP/CRP-abhängig ist, da mögliche Bindestellen für diesen globalen Regulator gefunden wurden (Boos et al., 1996). Die *malB*-Region von *E. coli* wurde schon ausgiebig hinsichtlich der Bindestellen für MalT und für das durch

cAMP aktivierte CRP untersucht. Die acht MalT-Boxen und drei hochaffinen CRP-Bindestellen liegen im intergenen Bereich zwischen den beiden divergenten Operonen *malE/F/G* und *malK/lamB/malM* (Raibaud et al., 1989; Vidal-Ingigliardi et al., 1991; Vidal-Ingigliardi & Raibaud, 1991). Für das *malK/lamB/malM*-Operon wurde gezeigt, dass ohne cAMP/CRP MalT an drei hochaffine MalT-Boxen bindet, dies aber nicht zu einer Transkription führt. Nur wenn alle drei CRP-Bindestellen besetzt sind, bindet der Aktivator an drei leicht versetzt liegende Boxen (Richet et al., 1991). Diese komplexe Nukleoproteinstruktur ermöglicht dann durch Interaktion mit der RNA-Polymerase die Initiation der Transkription. Für eine völlige Aktivität einer oder beider Promotoren müssen zwei weitere MalT-Boxen stromaufwärts von *malE/F/G* besetzt sein (Raibaud et al., 1989).

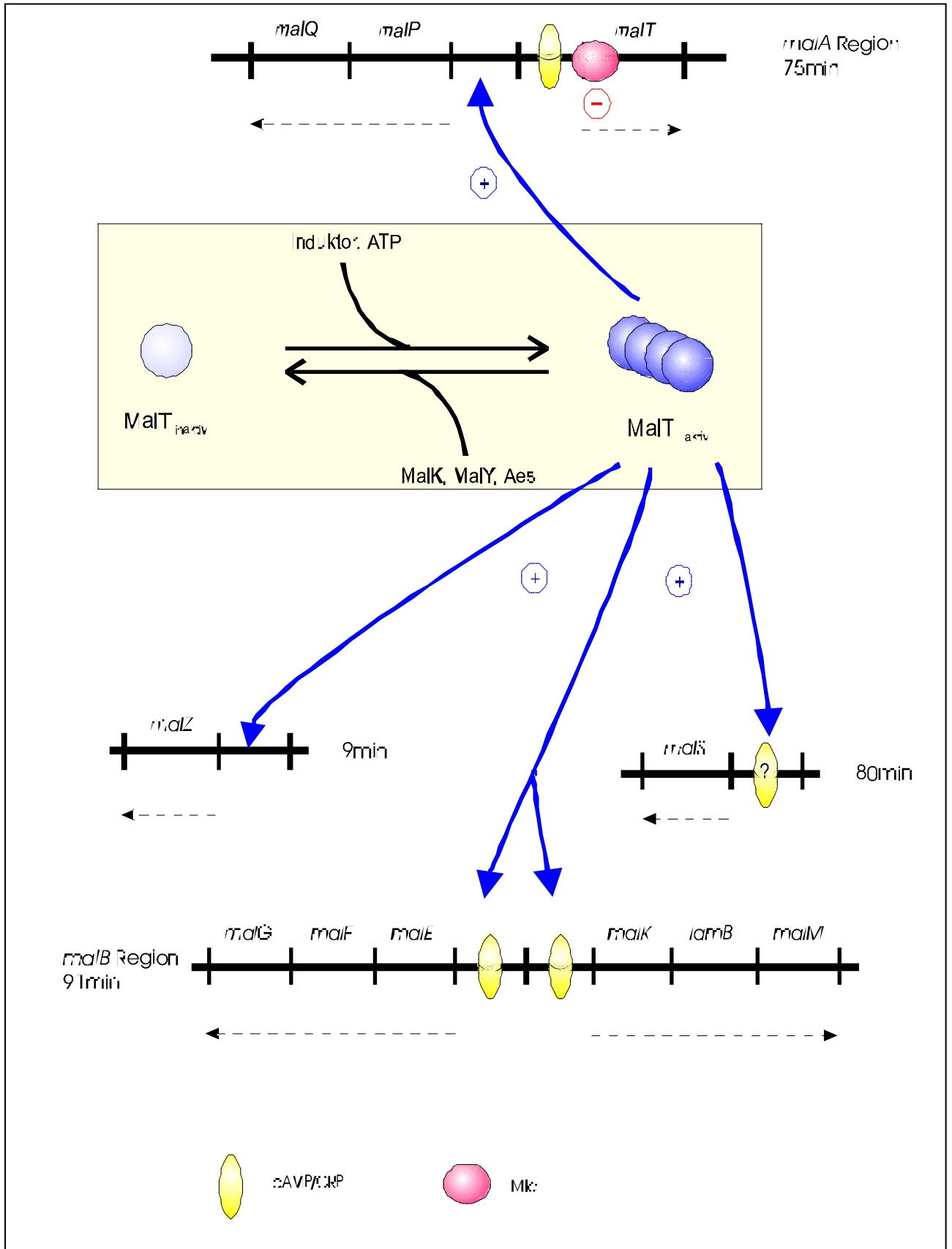
1.3.2 Die Regulation der *malT* Expression

Auch die Expression von *malT* wird über den cAMP/CRP-Komplex bestimmt, hingegen gibt es keine Autoregulation (Débarbouillé & Schwartz, 1979; Chapon, 1982; Chapon & Kolb, 1983). Die Abhängigkeit von diesem Transkriptionsaktivator macht *malT* zum direkten Ziel der Katabolitrepression.

Der *malT* Promotor wurde u.a. von Chapon & Kolb (1983) näher untersucht. Sie konnten anhand von „DNase I Footprinting“-Analysen beweisen, dass der cAMP/CRP-Komplex um die Position -70bp des Promotors binden muss. Er ist für die spezifische Bindung der RNA-Polymerase zuständig und absolut notwendig für die Initiation der Transkription des *malT* Gens. Lange Zeit war man der Meinung, dass CRP der einzige regulatorische Faktor der *malT* Expression ist, doch dem ist nicht so.

Ein weiterer Faktor, der die *malT* Expression beeinflusst ist der pleiotrophe Regulator Mlc. Dieser wurde bei der Suche nach Insertionsmutanten gefunden, welche die *malT* Expression erhöhen (Decker et al. 1998). Diesem Regulator konnte auch noch der Einfluss auf andere Gene von zuckerverwertenden Systemen, wie *ptsG* (Kimata et al., 1998; Plumbridge, 1998a; Oh et al. 1999), *ptsHI* (Kim et al., 1999; Plumbridge, 1999; Tanaka et al., 1999) des Glucosesystems und *manXYZ* des Mannosesystems (Plumbridge, 1998b), nachgewiesen werden.

Abbildung 1: Regulation und genetische Organisation des Maltoseregulons in *E. coli*



Die Aktivität von Mlc wird über den EIIB/C abhängigen Glucose Transport kontrolliert. Glucose ist demnach kein Effektor, sondern nur der Transportvorgang kann den Repressor inaktivieren. So konnte in neuesten Arbeiten gezeigt werden, dass der transportierende EIIC/B^{Glc}-Komplex die Fähigkeit besitzt Mlc zu binden (Lee et al., 2000). Als Folge dieser Interaktion ist der Repressor seiner regulatorischen Aufgabe entzogen und alle Mlc regulierten Gene sind dereprimiert. Darüberhinaus wird auch diskutiert, ob dadurch die Transportaktivität des EIIC/B^{Glc}-Komplexes beeinträchtigt wird, indem die Phosphorylierungsreaktion zwischen den generellen PTS Komponenten und dem Transporter verhindert wird (Lee et al., 2000).

MalT unterliegt vielen verschiedenen Regulationsmechanismen: Wahrscheinlich noch weiteren bisher unbekanntem transkriptionalen Mechanismen, sowie translationalen Einflüssen, wie dem von H-NS und StpA (Johansson et al., 1998) und Regulationen, die auf die Aktivität von MalT abzielen.

1.3.3 Die Rolle von MalK bei der Regulation des Maltosesystems

Ein weiteres für die Regulation des Maltosesystems wichtiges Protein ist MalK. Wegen seiner Funktion beim Maltosetransport, dient es als Angriffspunkt für das unphosphorylierte Enzym IIA^{Glc} des Phosphotransferasesystems (PTS) bei der „Inducer Exclusion“. Außerdem besitzt MalK einen repressorischen Einfluss auf alle *mal*-Gene. Obwohl eine *malK* Mutante keine Maltodextrine mehr transportieren kann und daher Mal⁻ ist (Davidson & Nikaido, 1990), bewirkt diese Mutation eine hohe und konstitutive Expression aller Maltosegene (Hofnung et al., 1974; Bukau et al., 1986). Dieser repressorische MalK-Effekt kann jedoch aufgehoben werden; entweder durch eine Überexpression von MalT oder durch eine *malT^c*-Mutation (Dardonville & Raibaud, 1990), die dazu führt, dass MalT bereits ohne oder mit minimalsten Mengen an Induktor Aktivatoraktivität besitzt.

MalK kann alle drei Funktionen, also den Transport und beide regulatorischen Einflüsse, unabhängig voneinander ausführen (Kühnau et al., 1991). So bleibt z.B. nach einer Mutation an der ATP-Bindestelle die regulatorische Fähigkeit bestehen, während ein Transport von Maltodextrinen nicht mehr möglich ist. Eine der regulatorischen Domänen scheint in 110 Aminosäuren langer Bereich des C-Terminus zu liegen, während das restliche Protein starke Homologien zu anderen Komponenten von ABC-Transportern zeigt. Dieser Befund und Analysen der Kristallstruktur von MalK aus *Thermococcus litoralis* (Diederichs et al., 2000) lassen den Schluss zu, dass dieser C-terminale Bereich für die Regulation von MalT durch MalK wichtig ist. Schon lange Zeit gab es Hinweise

hinsichtlich zweier verschiedener Zustände von MalK. Man ging davon aus, dass der Zustand von der jeweiligen Funktion abhängt, d.h. findet Transport statt, liegt das Protein membrangebunden als Transportkomponente vor, sonst ist es frei im Cytoplasma und kann als Regulator fungieren. (Übersicht in Boos & Shuman, 1998). Neuere Arbeiten führten zu einem Modell, welches folgendes besagt: In der Abwesenheit von exogenem Substrat liegt MalK, da kein Transport stattfindet, in einer inaktiven, ATP-gebundenen Form vor. In diesem Zustand bindet es an MalT, was seine aktivierende Wirkung auf die *mal*-Genexpression verliert (Panagiotidis et al., 1998), da der Regulator nicht mehr in der Lage ist zu Oligomerisieren (Schreiber & Richet, 1999). Liegt hingegen Substrat im Medium vor so besitzt MalK ausschließlich Transportfunktion.

1.3.4 Die Regulation des Maltosesystems durch MalY und Aes

Vor kurzem wurde die Interaktion zweier weiterer Proteine mit MalT bekannt. Außer MalK kann auch noch Aes (Peist et al., 1997) und MalY (Zdych et al., 1995) die MalT Aktivität negativ beeinflussen.

Das Gen für MalY ist Teil eines Genclusters, das bei 36 min auf dem *E. coli* Genom kartiert (Ehrmann & Boos, 1987). Es umfasst ein Operon mit *malX* und *malY*, das nicht von MalT abhängig ist und somit nicht mit zum Maltoseregulon gezählt werden darf. Kontrolliert wird dieses Operon von MalI, das Produkt des divergent dazu liegenden Gens. Dieser Repressor der LacI/GalR Familie reprimiert außer der eigenen auch die Expression des *malX/Y* Operons, d. h. eine Mutation in *malI* bewirkt eine konstitutive Expression dieses Operons (Reidl et al., 1989).

MalX ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert und zeigt Homologie zu den PTS-Enzymen IIC/B^{Glc} (34%) und EIIC/B^{N-Acetylglucosamin} (31%) (Reidl & Boos, 1991). In der Tat vermag MalX, wenn es überexpressiert wird, Glucose zu transportieren. Dies ist jedoch nicht das natürliche Substrat, so dass die physiologische Bedeutung unklar ist. Sicher ist, dass dieses Protein nicht für die negative Regulation des Maltosesystems verantwortlich ist, sondern die erhöhte Menge des zweiten Produkts MalY. Obwohl dieses Protein schwache Homologien zu Aminotransferasen aufweist, besonders in einer konservierten Region, konnte keinerlei Enzymaktivität dahingehend gemessen werden. Vielmehr verhält sich das gereinigte Enzym wie eine Kohlenstoff-Schwefel-Lyase (Zdych et al., 1995). Doch diese Eigenschaften haben nichts mit seiner regulatorischen Funktion zu tun. Diese kann, wie gezeigt wurde, mit einem erhöhten Spiegel an endogenem Induktor oder einer *malT^c* Mutation reduziert werden. Durch Mutanten, die

keine regulatorische Funktion mehr besitzen, zusammen mit der gelösten Kristallstruktur von MalY konnte ein Bereich identifiziert werden, der in der direkten Interaktion zwischen MalT und MalY involviert ist (Clausen et al., 2000).

Aes scheint ein weiteres Enzym mit zu MalY ähnlicher regulatorischer Funktion und Eigenschaft zu sein. Hierbei handelt es sich um ein Protein mit Acetyleraseaktivität, dessen Gen bei 10,8 min auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert wurde (Peist et al., 1997). Es wird vermutet, dass auch hier der Mechanismus der Regulation auf einer Interaktion mit MalT basiert. Aller Voraussicht nach interagieren MalY und Aes in der gleichen Art und Weise wie MalK mit dem Transkriptionsaktivator. Durch die Bindung dieser Proteine an MalT wird wahrscheinlich dessen Oligomerisierung unterbunden und somit die monomere inaktive Form stabilisiert, so dass die Maltosegene nicht mehr abgelesen werden können (Schreiber et al., 2000).

1.3.5 Die exo- und endogene Induktion

Wie schon in Kapitel 1.3.1. erwähnt braucht der Transkriptionsaktivator MalT für seine Oligomerisierung ATP und den internen Induktor Maltotriose (Raibaud & Richet, 1987; Schreiber & Richet, 1999). Nur in dieser aktiven Quartärstruktur kann MalT die Expression der *mal*-Gene aktivieren. Das Maltosesystem kann durch Zusatz von Maltose bzw. Maltotriose im Wachstumsmedium induziert werden (exogene Induktion) (Bukau et al., 1986), aber es findet auch eine endogene Induktorsynthese statt. Bisher sind zwei Möglichkeiten bekannt wie Maltotriose in der Zelle entstehen kann: Zum einen durch den Umsatz von Glykogen, zum anderen über einen sogenannten Glucoseweg.

Wie schon erwähnt zeigen *malQ*-Mutanten einen konstitutiven Phänotyp. Dies kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass Maltotriose und andere kleine Maltodextrine nicht mehr abgebaut werden können und somit im Innern akkumulieren. Unterbindet man nun aber in solchen Mutanten die Glykogensynthese durch Ausschaltung der dafür zuständigen Enzyme Glykogensynthetase (GlgA) oder ADP-Glucopyrophosphorylase (GlgC), so ist das Maltosesystem nicht mehr konstitutiv expremiert, aber noch exogen induzierbar. Es wird daher vermutet, dass der Induktor über einen bisher unbekanntem Weg aus Glykogen synthetisiert werden kann (Ehrmann & Boos, 1987; Decker et al., 1993).

Aber auch in Glykogen-defizienten Stämmen konnte eine endogene Induktorsynthese beobachtet werden, vorausgesetzt den Zellen steht Glucose und Glucosephosphat zur Verfügung. Dies ist z.B. beim Wachstum auf Trehalose der Fall. Die Endprodukte des

Trehalosekatabolismus sind Glucose und Glucose-6-Phosphat (Rimmele & Boos, 1994), das sich wiederum mit Glucose-1-Phosphat über die Phosphoglucomutase (Pgm) im Gleichgewicht befindet (Decker et al., 1993). Die freie Glucose, so wird postuliert, induziert das Maltosesystem. Diese Hypothese wird zusätzlich durch die Tatsache gestützt, dass in einem *ptsG/M glk* Stamm, aus Maltose und radioaktiv markierter Glucose u.a. markierte Maltotriose entsteht. Dieser Stamm kann die Glucose nur noch PTS-unabhängig transportieren und nicht mehr über die Glucokinase (*glk*) phosphorylieren, so dass viel freie Glucose zur Verfügung steht. Diese Induktion kann durch die Überexpression von *glk* negativ beeinflusst werden (Meyer et al., 1997). Die Regulation der *mal*-Gene ist ebenfalls durch die Mediumsoszolarität bestimmt. Doch weiß man darüber bisher nur, dass dieser Effekt mit dem Induktionszustand der Zelle in Zusammenhang steht. Denn eine erhöhte Salzkonzentration im Medium führt zu einer drastischen Repression der uninduzierten *mal* Gene, während dies nur im geringen Maße für den induzierten Zustand und für eine *malT^c* Mutante gilt (Bukau et al., 1986).

1.4 Das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferasesystem

Das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferasesystem (kurz PTS) nutzt zum Transport von Zuckern, wie z.B. Glucose oder Mannose, ein Mechanismus der Gruppentranslokation genannt wird. Dies bedeutet, dass der Zucker noch während des Transportvorgangs über die Cytoplasmamembran phosphoryliert wird.

Die Phosphotransferasesysteme in *E. coli* bestehen aus zwei generellen Proteinen (EI, HPr) und jeweils einem oder mehreren Zucker-spezifischen Enzymen (EII). EII kann drei oder vier Domänen besitzen, die auf einem einzelnen Polypeptid oder auf mehreren Proteinen liegen. Das Glucose-spezifische EII besteht aus zwei Proteinen: dem löslichen EIIA^{Glc} (*crr*) und dem Transportkomplex $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ (*ptsG*).

Während des Transports z.B. von Glucose wird eine Phosphatgruppe über eine Kaskade von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsschritten der einzelnen Komponenten von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf das hereinkommende Zuckermolekül übertragen. Die Phosphorylierungsstelle der beiden ersten Komponenten, EI (*ptsI*) und HPr (*ptsH*), ist jeweils ein Histidinrest an der Stelle 189 bzw. 15. Sie liegen in vielen Organismen konserviert vor (Weigel et al., 1982 a/b; Waygood, 1986). Durch sie werden alle zuckerspezifischen EII Proteine mit Phosphatgruppen versorgt. EIIA^{Glc} wird ebenfalls an einem Histidin an der Stelle 90 phosphoryliert und kann so mit der Transportkomponente $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ einen Komplex eingehen. Dabei wird der Phosphatrest auf das Cystein-421 der B-Domäne übertragen (Meins et al., 1988). Die integrale C-

Domäne bildet die Translokationspore durch die Membran. Bindet nun an einer spezifischen periplasmatischen Bindestelle Glucose, so wird diese auf die cytoplasmatische Seite transportiert. Durch die Phosphorylierung des Substrats mittels der B-Domäne kann nun das Zuckerphosphat vom Transportkomplex abdissoziieren. Das Phosphotransferase-System ist aber nicht nur ein wichtiger Transporter in *E. coli*, sondern spielt auch eine wichtige regulatorische Rolle über die Katabolitrepression und „Inducer Exclusion“, auf die in Kapitel 1.7 im Detail eingegangen wird.

1.5 Der cAMP/ CRP-Komplex als globaler Regulator

Der cAMP/ CRP-Komplex ist einer der wichtigsten globalen Regulatoren in *E. coli*. Er greift meist positiv, aber auch in einigen Fällen negativ, in die Transkription von 45 Genen und Operonen ein (Review Kolb et al., 1993). cAMP/CRP-abhängig sind zumeist katabole Systeme, aber auch einige andere Gene, wie die der Flagellensynthese.

Die Bindung von cAMP an CRP hat eine Konformationsänderung zur Folge, die den Regulator befähigt hoch spezifisch an bestimmte DNA Sequenzen, sogenannte CRP-Boxen, zu binden (McKay & Steitz, 1981; Weber & Steitz, 1987). Die 22bp lange Konsensussequenz dieser CRP-Boxen ist palindrom angeordnet und lautet 5'-AAATGTGATCT*AGATCACATTT-3' (Berg & von Hippel, 1988). Durch die Ähnlichkeit zu dieser optimalen Sequenz und dem Abstand der Boxen zum Transkriptionsstart, der in CRP-abhängigen Promotoren stark variiert, gibt es verschieden starke Induktion durch den Regulatorkomplex. Die Transkription des *crp* Gens selbst unterliegt sowohl positiven als auch negativen autoregulatorischen Mechanismen. Erste Studien zur *crp* Expression zeigten, dass cAMP/CRP für diese negative Regulation an eine spezifische hochaffine Bindestelle (Bindestelle I) stromabwärts des Promotors binden muss (Aiba, 1983; Cossart & Gicquel-Sanze, 1985). Die Bindestelle aktiviert einen zu *crp* divergenten Promotor (Okamoto et al., 1986; 1988). Die Autoren stellten das Modell einer „Antisense-RNA“-Regulation auf, welche diesen negativen Einfluss direkt bedingen sollte. Diese Idee konnte aber von Hanamura & Aiba (1991) widerlegt werden, da sie auch in Abwesenheit der „Antisense-DNA“ eine Hemmung der *crp* Transkription fanden. Man muss daher davon ausgehen, dass der Mechanismus rein sterischer Art ist. Wenn in *in vitro* Transkriptionsassays die Konzentration an cAMP und CRP erhöht wird, so findet man keine negative sondern eine positive Regulation. Diese ist von einer weiteren Bindestelle (Bindestelle II) abhängig, die nicht so affin zu sein scheint, da zur Stimulation des *crp* Promotors signifikant mehr cAMP/CRP benötigt werden als für die Inhibition (Hanamura & Aiba,

1992). So hängt diese duale Kontrolle von *crp* direkt von der Konzentration an Regulatorkomplex in der Zelle ab.

Während eine Erhöhung des cAMP/CRP-Spiegels die *crp* Expression ansteigen lässt, wird gleichzeitig die Menge an cAMP in der Zelle reduziert, da *cya*, das Gen für die Adenylatcyclase, negativ durch cAMP/CRP reguliert wird. Dieses Gen verfügt über drei Promotoren, von denen der stärkste über eine CRP-Box verfügt. Diese Bindestelle überlappt mit der RNA-Polymerase Bindestelle (Roy et al., 1983; Aiba et al., 1982, 1984), so dass die Bindung des Regulatorkomplexes die Transkription des Gens verhindert (Aiba, 1984; Mori & Aiba, 1985).

Neben der Beeinflussung der cAMP-Bildung auf transkriptionaler Ebene, gibt es auch noch eine Regulation über die Enzymaktivität. Sie ist bei der Katabolitrepession besonders wichtig. Dieser posttranskriptionale Mechanismus beruht auf der Regulation der Cyclaseaktivität durch das PTS-System (siehe dazu Kapitel 1.7.2). Aber auch andere Faktoren scheinen einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Aktivität zu haben. An dieser Stelle sei nur kurz die Rolle des anorganischen Phosphats als Aktivator der Adenylatcyclase und als Inhibitor der cAMP-Phosphodiesterase erwähnt (Harwood & Peterkofsky, 1975; Amin & Peterkofsky, 1995). Ebenfalls wurde eine hemmende Wirkung von Pyruvat, was für seine eigene Phosphorylierung eben dieses Phosphat in Form von ATP abzieht, beschrieben (Reddy et al., 1985). Ein weiterer regulierender Faktor scheint CRP zu sein, das außer auf die schon beschriebene Transkription auch auf die Cyclaseaktivität negativ einwirkt (Potter et al., 1974; Botsford & Drexler, 1978; Inada et al., 1996).

1.6 Die Anfänge der Erforschung der Katabolitrepession

Schon um 1900 beobachtete der Wissenschaftler Dienert an Hefezellen, die Glucose und Galaktose zum Wachsen zur Verfügung haben, dass zuerst die Glucose verbraucht wird bevor die Galaktose verstoffwechselt wird. Dazwischen ist eine kurze Phase des Nicht-Wachstums. Erst nach über 40 Jahren erkannte man, dass Glucose die Expression vieler abbauender Enzyme in *E. coli* beeinflusst (Epps & Gale, 1942).

Ein wichtiger Beitrag der Erforschung der Katabolitrepession machte J. Monod (1942). Er griff die Beobachtung von Dienert wieder auf und untersuchte dieses Phänomen, das er Diauxie nannte, im Detail. Er erkannte, dass das Aussehen der Wachstumskurve stark von der Art der Kohlenstoffquelle abhängt. Er konnte zwei Klassen von Zuckern unterscheiden, die, wenn man sie kombiniert, ein zweiphasisches Wachstum unterbrochen von einer Phase ohne Wachstum, zeigen. So verhindern Klasse A Zucker

(wie z.B. Glucose, Mannose und Fruktose) die Verwertung von Klasse B Substraten (u.a. Galaktose, Maltose Xylose, Glycerin), wenn man sie miteinander kombiniert. Gibt man hingegen Zucker einer Gruppe, ist die Kurve exponentiell.

In den folgenden Jahren konnte dann gezeigt werden, dass diese Klasse A Zucker die Aufnahme der Induktoren der Klasse B Systeme verhindern, indem sie die Aktivität der Transporter oder den ersten Stoffwechselschritt hemmen (Cohn & Horibata, 1959; McGinnis & Paigen, 1969). Dieses Phänomen nennt man heute „Inducer Exclusion“.

Der Begriff „Katabolitrepession“ wurde von Magasanik 1961 geprägt, doch hatte er noch keine richtige Vorstellung, was den Mechanismus dieses Phänomens betrifft.

Erst die Entdeckung zweier wichtiger Komponenten machte ein besseres Verständnis möglich. Zum einen war dies die Beschreibung des PEP-abhängigen Phosphotransferase-systems (kurz PTS) in *E. coli* und die Charakterisierung seiner Komponenten anhand verschiedener Mutanten in Rosemans Labor (Kundig et al., 1964). Zum anderen war die Entdeckung des cAMPs bei *E. coli* durch Makman und Sutherland im Jahre 1965 ein weiterer wichtiger Schritt. Nun erkannte man nämlich die Rolle dieses Alarmons bei der Katabolitrepession. Man fand, dass die Zugabe von Glucose eine Erniedrigung des cAMP-Spiegels zur Folge hat. Doch die Forderung, dass dann die Zugabe von cAMP die Katabolitrepession aufheben müsste, wurde immer kontrovers diskutiert (Ullman & Monod, 1968; Goldenbaum & Dobrogosz, 1968; Perlman et al., 1969; Yang et al., 1979). In dieser Zeit wurde in zwei Laboren gleichzeitig ein spezifisches cAMP-Bindeprotein isoliert und gereinigt. Es zeigte sich, dass dieses Protein bei dem Phänomen der Derepression durch cAMP eine Rolle spielt und zusammen mit cAMP als ein Transkriptionsaktivator fungiert. Dieses Protein wurde „catabolite gene activator protein“ (CAP) (Zubay et al., 1970) oder „cAMP receptor protein“ (CRP) (Emmer et al, 1970) genannt. Im selben Jahr noch kamen Pastan & Perlman (1970) zu dem Schluss, dass alle induzierbaren Systeme des Metabolismus unter der Kontrolle von cAMP und seinem Rezeptorprotein stehen.

Die Synthese der katabolen Enzyme schien durch zwei unterschiedliche Prozesse reguliert zu werden: Erstens der sogenannten „Katabolitrepession“, deren Mechanismus über die Inhibierung der Synthese von cAMP läuft. Und zweitens durch die „Inducer Exclusion“, die, wie ihr Name schon besagt, die Aufnahme des Induktors verhindert. Diese werden nun im Folgenden behandelt.

1.7 Die Regulation des Stoffwechsels durch das Glucose PTS

1.7.1 „Inducer Exclusion“

Mit „Inducer Exclusion“ wird ein Phänomen beschrieben, bei dem Glucose die exogene Induktion von katabolen Systemen hemmt, indem es den Transport oder die Entstehung des Induktors verhindert. Die „Inducer Exclusion“ ist der Hauptmechanismus der Diauxie.

Schon lange Zeit ist bekannt, dass die Hemmung der Permeasen durch eine direkte Interaktion einer Komponente des PTS, und zwar dem Enzym EIIA^{Glc} , mit Transporterproteinen zustande kommt. Wie man in Abbildung 2 sehen kann, liegt EIIA^{Glc} in zwei physiologisch wirksamen Formen in der Zelle vor: In einem phosphorylierten ($\text{EIIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$) und einem unphosphorylierten (EIIA^{Glc}) Zustand. Die Menge an $\text{EIIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ wird durch die Balance zwischen Phosphorylierung durch HPr-P und Dephosphorylierung durch $\text{EIIIC/B}^{\text{Glc}}$ während des Glucosetransports bestimmt. Das unphosphorylierte EIIA^{Glc} besitzt die Eigenschaft an bestimmte Zielproteine, wie Permeasen (z.B. die Lactosepermease LacY (Osumi & Saier, 1982a/b; Nelson et al., 1983) oder einzelne Untereinheiten von Transportsystemen, z.B. MalK (Postma et al., 1988; Dean et al., 1990), zu binden. Eine kleine Ausnahme bildet hier das Glycerinphosphatsystem. In diesem speziellen Fall ist die Kinase GlpK betroffen (Postma et al., 1984), die den ersten Schritt des Metabolismus, und zwar die Phosphorylierung von Glycerin zu Glycerin-3-Phosphat, dem Induktor dieses Systems, katalysiert. Es wurde gezeigt, dass für die Bindung von EIIA^{Glc} an diese Zielproteine die Anwesenheit der jeweiligen Substrate wichtig ist. Denn nur diese Konformation, die das Protein einnimmt, wenn Substrat gebunden ist, erkennt EIIA^{Glc} . Auf diese Weise wird ein Austitrieren von EIIA^{Glc} unter Bedingungen verhindert, unter denen keine Regulation nötig ist.

Obwohl die Interaktion von EIIA^{Glc} mit vielen Proteinen im Detail untersucht ist, gibt der Mechanismus wie die Zielproteine inhibiert werden immer noch Fragen auf. Zum Beispiel ist der zentrale Loop der Lactosepermease zwar die Bindestelle für EIIA^{Glc} , aber unwichtig für die Transportaktivität (Bibi & Kaback, 1990). Daher nimmt man an, dass eine Konformationsänderung induziert wird, die den Kanal, durch den die Zucker transportiert werden, blockiert.

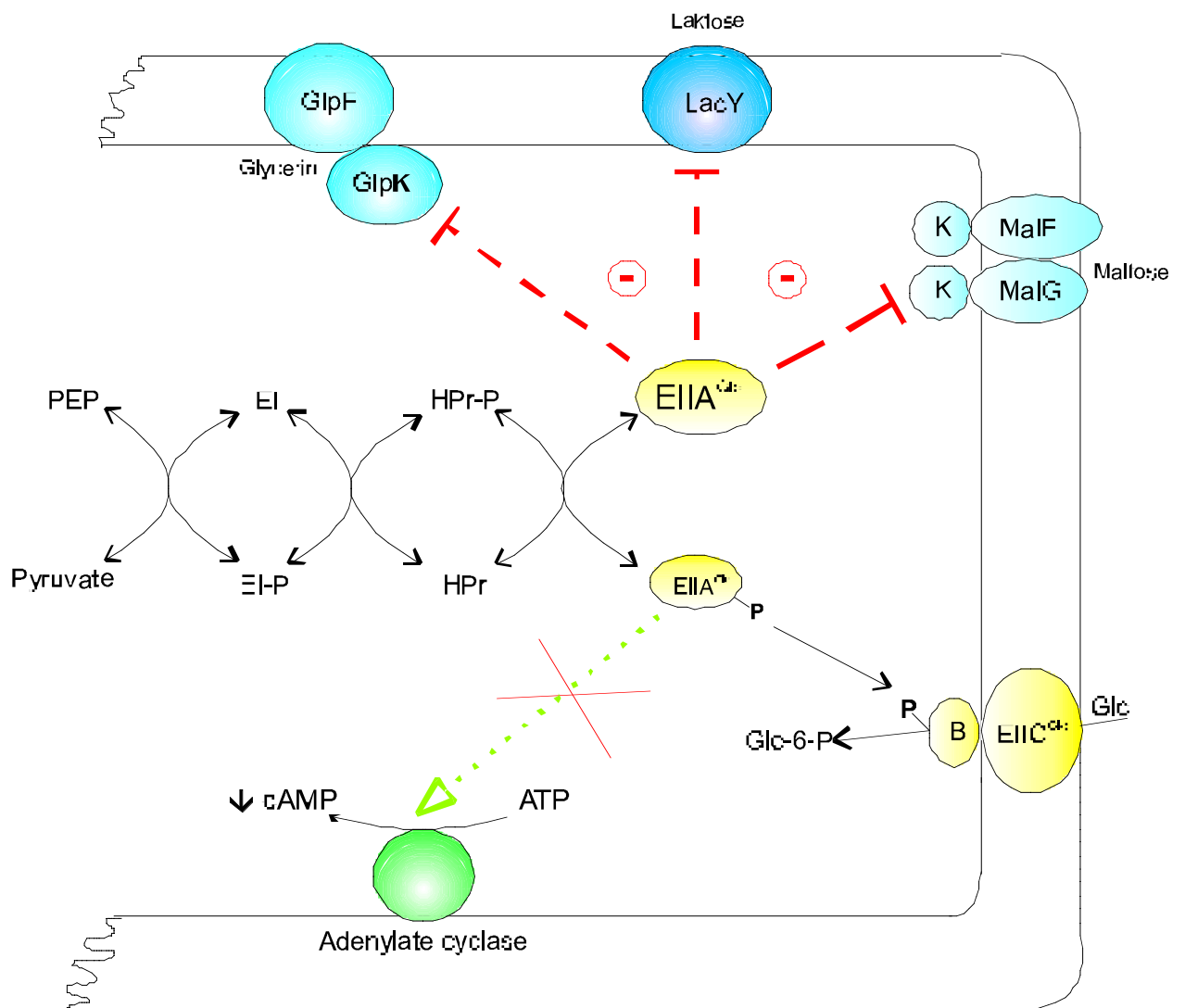


Abbildung 2: Einfluss des PTS auf die Adenylatcyclase und „Inducer Exclusion“

Schematisch dargestellt ist die Hemmung der Transportsysteme für Lactose und Maltose bzw. dem ersten Stoffwechsellenzym des Glycerinabbaus durch EIIA^{Glc} („Inducer Exclusion“). Außerdem ist der Glucoseeffekt zusehen, der sich verursacht durch den Transport, auf die Aktivität der Adenylatcyclase auswirkt.

1.7.2. Die Regulation der Adenylatcyclase durch Enzym EIIA^{Glc}

Die Katabolitrepression in *E. coli* ist ein Phänomen bei dem bestimmte Zucker die Expression von Genen inhibieren, die wichtig für den Metabolismus anderer Kohlenstoffquellen sind. Die Schlüsselrolle spielt auch hier, wie bei der „Inducer Exclusion“, das Enzym EIIA^{Glc}.

Das Modell für die Regulation besagt (Abb.2), dass die phosphorylierte Form die Adenylatcyclase Aktivität stimuliert. Glucosetransport würde dann bewirken, dass in Folge eines Anstiegs an unphosphoryliertem Proteins die cAMP-Synthese sinkt. Dies würde die Erniedrigung der Expression aller cAMP/CRP-abhängiger Systeme bedeuten.

Der Phosphatrest in EIIA^{Glc}-P besitzt wahrscheinlich wichtige Funktion bei der Aktivierungsreaktion. Die Kristallstruktur von EIIA^{Glc} macht deutlich, dass mit der Phosphorylierung des Proteins keine große Konformationsänderung einhergeht (Liao et al., 1991; Worthylake et al., 1991). Es wurde daher vorgeschlagen, dass die negative Ladung des H90-P wichtig für die Interaktion mit der Adenylatcyclase ist. So kann durch diese Wechselwirkungen ein stabiler Komplex gebildet werden (Reddy & Kamireddy, 1998).

Obwohl eine direkte Interaktion noch nicht nachgewiesen werden konnte, gibt es doch einige genetische und biochemische Beobachtungen, die dieses Modell stützen (Review Postma et al., 1993; Kolb et al., 1993): (i) In Anwesenheit von PTS-abhängig transportierten Zuckern sinkt die Synthese von cAMP. (ii) *pts* Mutanten, die durch eine *crr* Mutation kein EIIA^{Glc} mehr synthetisieren, besitzen eine ebenso verringerte Adenylatcyclase Aktivität auch ohne PTS Zucker (Feucht & Saier, 1980; Nelson et al., 1982). Den selben Phänotyp zeigen gleichzeitig solche Mutanten, die in Enzym I oder HPr mutiert sind und daher nicht mehr in der Lage sind das nachfolgende Enzym zu phosphorylieren. (iii) Außerdem kann beobachtet werden, dass eine EIIA^{Glc} Mutante, deren Histidin der Phosphorylierungsstelle durch ein Glutamat ersetzt wurde, keine stimulierende Wirkung in toluolisierten Zellen mehr aufweist.

Wichtig für die EIIA^{Glc}-P abhängige Regulation scheint der C-terminale Bereich der Cyclase zu sein, während im N-Terminus die katalytische Domäne sitzt (Roy et al., 1983; Holland et al., 1988). Doch die Art der Beeinflussung ist weitgehend unverstanden. Ebenfalls unklar ist die Beteiligung weiterer Faktoren wie z. B. Orthophosphat oder dem unphosphorylierten EIIA^{Glc}. Der negative Einfluss, den das Protein haben soll, wird immer noch sehr kontrovers diskutiert (siehe dazu Postma 1993), ist aber eher unwahrscheinlich (Reddy & Kamireddy, 1998). Aufgrund von Arbeiten u.a. von Peterkofsky und Mitarbeitern (Überblick in Peterkofsky et al., 1993)

wurde spekuliert, ob EI und HPr ebenfalls involviert sind. Demzufolge müsste der gesamte Komplex die Aktivitätsänderung beeinflussen (Reddy et al., 1985).

1.8 Die Frage nach der Allgemeingültigkeit des klassischen Modells

Schon früh war klar, dass das gerade beschriebene Modell nicht der einzige Mechanismus sein kann, durch den Katabolitrepression in Bakterien entsteht. Denn immer wieder wurden Phänomene beobachtet, die nicht in die gültige Modellauffassung passten. Erste Zweifel an der Allgemeingültigkeit kamen auf als entdeckt wurde, dass Gram-positive Bakterien, wie z.B. *Bacillus subtilis*, zwar Katabolitrepression zeigen, aber kein cAMP besitzen. Die Katabolitrepression läuft in diesen Organismen HPr abhängig ab. Dieses Protein des PTS wird von HPr(Ser.)- Kinase am Ser.-46 phosphoryliert und interagiert mit Regulatoren, wie z.B. CcpA. Der Komplex bindet an sogenannte *cre* Bindestellen der sensitiven Promotoren und verhindert somit die Transkription der Gene (Review Saier et al., 1996).

Viele Studien zeigten, dass cAMP auch in Gram-negativen Bakterien nicht der einzige Vermittler der Katabolitrepression ist. So wurden Fälle beschrieben, bei denen die Zugabe von cAMP eine Repression nicht aufheben konnten. Ein anderes Beispiel ist die Repression in Mutanten, denen das Adenylatcyclasegen fehlt, dafür aber ein cAMP-unabhängiges CRP* besitzen. Dieser Befund wurde von Aiba und Mitarbeiter durch die Rolle von CRP bei der Katabolitrepression erklärt (Ishizuka et al., 1993). Sie konnten zeigen, dass die Menge des CRP* in Anwesenheit von Glucose abnimmt und somit auch über dieses Protein eine Modulation möglich ist.

Ebenso wurde ein sogenannter „*catabolite modulation factor*“ (CMF) postuliert, der auf Katabolitrepressions-sensitive Systeme in Anwesenheit von Glucose wirkt. Laut dieser Theorie soll dieser Faktor die Bindung von cAMP an CRP beeinflussen (Ullmann et al., 1976; Danley et al., 1977; Dessen et al., 1978). Er konnte aber niemals identifiziert werden.

Ein besser verstandener Faktor ist das Cra-Protein („*catabolite repressor/ activator protein*“), früher auch FruR genannt (Saier & Ramseier, 1996). Cra beeinflusst die Richtung des Kohlenhydratflusses. Basierend auf Ergebnissen aus Untersuchungen mit *cra* Mutanten konnte gezeigt werden, dass Gene des oxidativen Stoffwechsels und der Gluconeogenese positiv durch Cra reguliert werden; während anabole Systeme reprimiert sind (Ramseier et al., 1995). Die Adenylatcyclaseaktivität bleibt durch Cra jedoch unbeeinflusst (Crasnier-Mednansky et al., 1997).

Die Alarmone Guanosin-5'-Diphosphat-3'-Diphosphat (ppGpp), Diadenosin-Tetraphosphat (AppppA) und 2-Ketobutyrat wurden auch schon in Zusammenhang mit der Katabolitrepression erwähnt. Ersteres ist ein Signalmolekül, welches die stringente Kontrolle induzieren kann. Dies wird beobachtet, wenn die Kapazität an tRNA während der Proteinsynthese zu gering wird, z.B. wenn einer auxotrophen Mutante die essentielle Aminosäure fehlt (Review Cashel et al., 1996). ppGpp akkumuliert bei Kohlenstoff-, Phosphat- und Aminosäuremangel in der Zelle. Das Alarmon wird als pleiotropher regulatorischer Effektor mit positiver als auch negativer Wirkung auf die Genexpression in Bakterien beschrieben. Der Mechanismus beider Effekte scheint primär die Initiation der Transkription zu betreffen (Choy, 2000).

AppppA hingegen scheint u.a. ein Signal für Hitzeschock und oxidativem Stress zu sein. Die Akkumulation macht sich aber auch bei der Transkription von katabolen Systemen negativ bemerkbar (Farr et al., 1989). Das dritte Alarmon in dieser Reihe ist 2-Ketobutyrat, ein Vorläufer des Isoleucins. Auch hier konnte ein Einfluss auf cAMP/CRP regulierte Gene gezeigt werden, der wahrscheinlich über die Adenylatcyclase Aktivität gesteuert wird und von PTS Komponenten abhängt (Daniel et al., 1983; Daniel et al., 1984a/b). Die Funktion und der Mechanismus dieser beschriebenen Faktoren ist zwar unklar, aber dennoch möglich.

Über Jahre konnte sich niemand die Beobachtungen erklären, dass auch Kohlenstoffquellen, die über andere Transporter als das PTS in die Zelle gelangen, eine mehr oder weniger starke Katabolitrepression hervorrufen können. Von Hogema et al. (1997) wurde z.B. eine starke Repression durch Glucose-6-Phosphat (Glc6P) beschrieben. Er konnte zeigen, dass dieser Zucker die Menge an cAMP und CRP beeinflusst. Doch einen großen Teil der Repression wird dem Effekt der „Inducer Exclusion“ zu geschrieben (Hogema et al., 1998). Hierbei soll auch das Enzym EIIA^{Glc} eine Rolle spielen. Glc6P, wie auch andere Zucker, können, obwohl sie nicht über PTS transportiert werden, das Verhältnis der phosphorylierten zur unphosphorylierten Form ändern. Die Dephosphorylierung des Proteins ist bei einigen Kohlenstoffe in ihren Ausmaßen sogar mit der von PTS Zuckern vergleichbar (Hogema et al. 1998a/b). Hogema postulierte, dass die treibende Kraft bei dieser Änderung von $\text{EIIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ zu EIIA^{Glc} in der Änderung des Verhältnisses von PEP zu Pyruvat in der Zelle zu suchen ist (Hogema et al., 1998b).

1.9 Vorarbeit und Zielsetzung der vorliegenden Promotionsarbeit

Der Mechanismus der Regulation der klassischen Katabolitrepression durch Glucose oder anderen PTS Zuckern ist gut untersucht. Das Modell besagt, dass die Dephosphorylierung von EIIA^{Glc}, verursacht durch den Transport von PTS abhängigen Zuckern, „Inducer Exclusion“ und Katabolitrepression hervorruft.

Diese Arbeit beschäftigt sich nun mit der Katabolitrepression hervorgerufen durch Kohlenstoffe, die nicht über das PTS transportiert werden. Als Modellsystem wurde der Einfluss der Nicht-PTS Kohlenstoffquelle Glycerin auf das Maltosesystem gewählt. Glycerin gelangt über erleichterte Diffusion mit Hilfe des Facilitators GlpF in die Zelle, wo es dann sofort durch die Kinase GlpK zu Glycerin-3-Phosphat (G3P) phosphoryliert wird. Für die phosphorylierte Form existiert in der Cytoplasmamembran zusätzlich noch eine Permease (GlpT). Schon vor Beginn dieser Arbeit wurde entdeckt, dass der Zusatz von Glycerin bzw. G3P ins Wachstumsmedium eine Reduktion der Expression der Maltosegene bewirkt. Dieses repressorische Phänomen wurde „Glycerineffekt“ genannt (Eppler Diplomarbeit, 1997). Das Ziel der Repression durch Glycerin ist MalT, der positive Transkriptionsregulator des Maltosesystems, über den es Einfluss auf das ganze Regulon ausübt. Der Effekt ist aber nicht spezifisch für das Maltosesystem, sondern gilt auch für andere katabole Systeme. Die Regulation wird über G3P vermittelt. Dies konnte anhand von Stoffwechselmutanten des *glp*-Systems gut gezeigt werden, da der Abbauweg nicht sofort in die Glykolyse einmündet, die schlecht zu blockieren ist. Diese Studie konnte belegen, dass eine Glycerinkinasemutante, da sie kein G3P mehr synthetisieren kann, nicht mehr durch Glycerin reprimiert wird. Gibt man diesen Zellen jedoch G3P, so ist dies wieder möglich. Das phosphorylierte Glycerin ist demnach für die Repression zwingend notwendig, ein weiterer Abbau dieser Substanz jedoch nicht. Das konnte mit dem Blockieren des nächsten Stoffwechselschrittes bewiesen werden. Diese *glpD* Mutante, die keine aerobe G3P Dehydrogenase mehr besitzt und somit G3P nicht weiter abbauen kann, wird durch Glycerin oder G3P noch reprimiert (Eppler Diplomarbeit, 1997).

Dieser Befund zeigte, dass es sich hierbei um einen Mechanismus handeln muss, der noch nie zuvor beschrieben wurde. Diese Thematik bildete die Ausgangsbasis für weitere, detailliertere Untersuchungen. Bisher ging man immer davon aus, dass bei der Katabolitrepression durch Nicht-PTS Zucker die jeweiligen Kohlenstoffquellen verstoffwechselt werden müssen (siehe Kapitel 1.7.). Daher war es ein Ziel zu untersuchen, ob Glycerin eine Ausnahme darstellt oder ob das Modell für andere Systeme ebenso Gültigkeit hat. Diese Hypothese sollte anhand weiterer Stoffwechselmutanten in anderen Systemen verifiziert werden. Das Hauptziel dieser Arbeit war

jedoch die Charakterisierung des Mechanismus der Katabolitrepression durch Glycerin. Sie sollte durch unterschiedliche Denkansätze gestützt werden, um ein Gesamtmodell zum Verständnis dieser Regulation zu erarbeiten. Dies beinhaltet die Untersuchung der Rolle von Komponenten der klassischen Katabolitrepression, wie $EIIA^{Glc}$ und der Adenylatcyclase, ebenso wie der von CRP und anderen vielleicht neuen Regulationsmechanismen.

2. Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
β -Gal	β -Galaktosidase
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
CRP	„cAMP receptor protein“
Cm, Cam	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
Glc	Glucose
Gluc	Gluconat
Glyc	Glycerin
G3P	Glycerin-3-Phosphat
Glc6P	Glucose-6-Phosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani Broth
M	Molar (Mol/Liter)
Mal	Maltose
MMA	Minimalmedium A
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ONPG	Orthonitrophenyl β -D-Galaktopyranosid
rpm	[engl.]; Umdrehungen pro Minute
r	Resistent
SDS	[engl.]; Natrium Dodecyl Sulfat
Tet	Tetracyclin
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktopyranosid
Xyl	Xylose
Xyl5P	Xylulose-5-Phosphat

2.3 Verwendete Bakterienstämme, Phagen und Plasmide

Tabelle 1: Bakterienstämme

Stammname	relevanter Genotyp	Referenz oder Quelle
Bre1161	MC4100; F(<i>malT-lacZ</i>)1110 (1 <i>plac</i> Mu50)	Bremer et al., 1985
Bre1162	MC4100; F(<i>malK-lacZ</i>)1110 (1 <i>plac</i> Mu50)	Bremer et al., 1985
ET16	Bre1161; <i>glpF</i> ::Tn10, <i>glpK</i>	Eppler, 1997
ET18	Bre1161; <i>glpD3</i> , <i>glpR zhe-733</i> ::Tn10	Eppler, 1997
ET23	HS3084; <i>Dcya crp*</i> <i>ilv</i> ⁺	Eppler, 1997
ET24	Bre1161; <i>Dcya crp*</i> <i>ilv</i> ⁺	Eppler, 1997
ET25	POP3506; <i>Dcya crp*</i> <i>ilv</i> ⁺	Eppler, 1997
ET107	MC4100; <i>mlc</i> ::Kan	diese Arbeit
ET117	HS3084; Δ <i>crp</i>	diese Arbeit
ET125	HS3084; Δ <i>crr</i> ::Kan	diese Arbeit
ET126	Bre1161; Δ <i>crr</i> ::Kan	diese Arbeit
ET127	POP3506; Δ <i>crr</i> ::Kan	diese Arbeit
ET128	Bre1162; Δ <i>crr</i> ::Kan	diese Arbeit
ET130	ET23; <i>purK</i> ::Cam	diese Arbeit
ET131	ET23; <i>purT</i> ::Cam	diese Arbeit
ET160	Bre1161; <i>glpD3 glpK</i> ::Cam	diese Arbeit
ET182	Bre1161; <i>pgm</i>	diese Arbeit
ET185	ET160; Δ <i>crr</i>	diese Arbeit
ET186	ET160; <i>ptsI</i> :: <i>spec</i>	diese Arbeit
ET187	Bre1161; <i>pgi</i> ::Tn10	diese Arbeit

Stammname	relevanter Genotyp	Referenz oder Quelle
ET190	Bre1161; <i>cya*</i> $\Delta(800-848)$ <i>SphI</i> Cam	diese Arbeit
ET194	Bre1161; <i>galT</i>	diese Arbeit
ET196	Bre1161; <i>cya*</i> $\Delta(800-848)$ <i>SphI</i> Cam; <i>Δcrr</i>	diese Arbeit
ET214	ET23; <i>narU::</i> Cam	diese Arbeit
ET215	ET23; <i>glpX::</i> Cam	diese Arbeit
HS3084	MC4100; F(<i>malK⁺ -lamB-lacZ</i>)42-1	Emr & Silhavy, 1980
MC4100	F ⁻ <i>araD139 D(argF-lac) U169</i> <i>rpsL150 relA1deoC1 ptsF25 rbsR</i> <i>flbB5301</i>	Casadaban, 1976
POP3506	MC4100; F(<i>malT-lacZ</i>)	Laborsammlung

Die Nomenklatur entspricht der von Bachman (1990).

Tabelle 2: Phagen

Phage	bekannter Genotyp	Referenz oder Quelle
P1 _{vir}	transduzierender Phage	Laborsammlung
λ NK1324	P _{am80} λ „Hopper Phage“; Mini- <i>Tn10::</i> Cam	Kleckner et al., 1991

Tabelle 3: Plasmide

Plasmid	bekannter Genotyp	Referenz oder Quelle
pAP47	pBR322 Derivat; <i>apaH</i> unter wt Promotor; Amp ^r	Mechulam et al. , 1985
pBCP260	<i>crr</i> unter <i>Ptac</i> ; <i>lacI^q</i> ; Amp ^r	van der Vlag, 1994
pBR322	Klonierungsvektor; Amp ^r , Tet ^r	Bolivar et al., 1977

Plasmid	bekannter Genotyp	Referenz oder Quelle
pDCRP	pBR322 Derivat; <i>crp</i> unter wt Promotor; Amp ^r	Bell et al., 1990
pGPH9260	(<i>malTp1malTp10'-lacZ⁺</i>) ₁ in pJEL250; Amp ^r	Alonzo et al., 1998
pGLamB	<i>lamB</i> unter T7 Promotor; Amp ^r	Michael Ehrmann, Laborsammlung
pPurK	pTrc99A Derivat mit <i>purK</i> ; Amp ^r	diese Arbeit
pTrc99A	Expressionsvektor; Amp ^r	Amann et al., 1988

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Medien

Die Medien wurden nach Miller (Miller, 1972) und Silhavy (Silhavy et al., 1984) hergestellt. Sie wurden 20min bei 120°C und einem Druck von 1bar autoklaviert, auf 40-50°C abgekühlt und dann je nach Bedarf mit hitzelabilen Medienzusätzen versetzt.

Zur Herstellung von festen Medien wurden noch zusätzlich 16g/l Span Agar (bei LB und TB), bzw. 16g/l Difco Bactoagar (bei MMA) eingewogen. Nach dem Abkühlen auf 40°-50°C wurden ebenfalls je nach Bedarf hitzeempfindliche Zusätze beigemischt und nach dem Gießen der Platten wurden diese bei +4°C aufbewahrt.

LB (auf ein Liter deionisiertes Wasser): 10g	Bacto-Trypton	
	Hefeextrakt	5g
	NaCl	10g
TB (auf ein Liter deionisiertes Wasser):	Bactotrypton	10g
	NaCl	8g

MMA (auf ein Liter deionisiertes Wasser):	K_2HPO_4	10,5g
	KH_2PO_4	4,5g
	$(NH_4)_2SO_4$	1g
	Natriumcitrat	0,5g
	$MgSO_4$ ¹⁾	10mM
	Kohlenstoffquelle ²⁾	0,2 bzw. 0,4% (w/v)

¹⁾ Getrennt autoklaviert

²⁾ Sterilfiltriert

2.4.2 Kohlenstoffquellen und andere Medienzusätze

Folgende Zusätze wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien je nach Bedarf zugegeben:

Tabelle 4: Kohlenstoffquellen und andere Medienzusätze

Substanz	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin ¹⁾	H ₂ O	100µg/ml
Arabinose ¹⁾	H ₂ O	0,4% (w/v)
caa ¹⁾	H ₂ O	1% (w/v)
Chloramphenicol ³⁾	70% Ethanol	15- 30µg/ml
Galactose	H ₂ O	0,4% (w/v)
Glucose ¹⁾	H ₂ O	0,2% (w/v)
Glc6P ¹⁾	H ₂ O	0,4% (w/v)
Glycerin ²⁾ , G3P ¹⁾	H ₂ O	0,4% (w/v)
Kanamycin ¹⁾	H ₂ O	100µg/ml
Maltose ¹⁾	H ₂ O	0,2% (w/v)

Natriumcitrat ²⁾	H ₂ O	20mM
Substanz	Lösungsmittel	Endkonzentration
Rhamnose ¹⁾	H ₂ O	0,4% (w/v)
Spectinomycin ¹⁾	H ₂ O	5µg/ml
Tetracyclin ³⁾	70% Ethanol	10µg/ml
X-Gal ³⁾	Dimethyl- formamid	30µg/ml (wenn nicht anderst angegeben)
Xylose ¹⁾	H ₂ O	0,4% (w/v)

¹⁾ Sterilfiltriert (Milliporfilter; Porendurchmesser 0,45µm)

²⁾ Getrennt autoklaviert

³⁾ Bedürfen keiner Sterilisation

2.4.3 Kulturbedingungen

Die *Escherichia coli* Kulturen wuchsen generell aerob bei 37°C. Flüssigkulturen bis zu 5ml wurden in Reagenzgläser im Roller, die darüber in Erlenmeyerkolben auf dem Schütteltisch angezogen, so daß immer ein ausreichender Luftraum zur Belüftung vorhanden war. Sie wurden zumeist mit einer Übernachtvorkultur im Verhältnis 1:100 in die gewünschten Kulturmedien angeimpft. Eine Übernachtkultur hatte ein definiertes Wachstum von 18h. Medien und Zusätze sind Kapitel 2.4.1. und 2.4.2. zu entnehmen. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Stämme als sogenannte DMSO Dauerkulturen (140µl DMSO auf 2ml Kultur) bei -80°C eingefroren.

2.4.4 Zelldichtemessung

Die Zelldichte einer Flüssigkultur läßt sich nach Miller (1972) photometrisch bestimmen. Und zwar entsprechen einer optischen Dichte bei 578nm (OD₅₇₈) von 1 ca. 8x 10⁸ Zellen und 107mg Protein pro 1ml Kultur.

2.5 Genetische und molekularbiologische Methoden

2.5.1 Grundlegende Techniken mit Nukleinsäuren

Zur Gewinnung von Plasmid- oder chromosomaler DNA wurde das „QIAprep-“ bzw. „QIAamp Tissue-Kit“ der Firma Qiagen GmbH Hilden nach Herstellerangaben angewandt.

Protokolle von Standardtechniken wie PCR, Agarosegelelektrophorese, Ligation und Restriktionsverdau sind Sambrook et al. (1989) und Maniatis et al. (1982) zu entnehmen. DNA-Fragmente wurden standardmäßig anhand von Agarosegelelektrophorese kontrolliert und zur weiteren Verwendung mit dem „QiaQuick Gel Extraction-Kit“ (Qiagen) aus dem Gel eluiert.

Die Transformation von Bakterien erfolgte bei Ligationsansätzen durch Elektroporation (BioRad Gene Pulser) oder chemisch nach der Methode von Inoue et al. (1990). Ansonsten kam die TSS-Transformationen nach Chung et al. (1989) zur Anwendung.

2.5.2 Stammkonstruktionen

Alle in dieser Arbeit beschriebenen *E. coli* Stämme sind in Tabelle 1 aufgelistet und wurden, wenn nicht anders beschrieben, mittels Transduktion mit dem Bakteriophagen P1 konstruiert (Miller, 1972; 1992). Nach der Konstruktion wurden die Stämme auf das Vorhandensein des jeweilige Phänotyps getestet.

2.5.3 *In vivo* Isolierung Mini Tn10-Insertionen

Zur *in vivo* Isolierung von Cam-Insertionen wurde der λ -Phage λ NK1324 benutzt (Kleckner et al., 1991). Dieser Phage wurde zur Transposonmutagenese in *E. coli* konstruiert und trägt ein Transposon das zwischen den äußeren 70bp der „inverted repeats“ des rechten IS10 ein Chloramphenicolresistenzgen aus Tn9 trägt. Darüber hinaus besitzt er ausserdem ein *Ptac-ats1 ats2* Transposasegen in cis Stellung. Er ist nicht mehr in der Lage sich in Wildtypstämmen zu replizieren und daher muß man sogenannte Repressorstämme dazu verwenden.

Die Stämme ET23/pGLamB bzw. HS3084/pGLamB wurde wie in der Beschreibung von Kleckner et al. mit dem Phagen λ NK1324 infiziert und auf Selektionsplatten (LB mit

15µg/ml Cam; 20mM Na-Citrat; 0,4% Glycerin; 30µg/ml X-Gal) ausplattiert. Die identifizierten Klone wurden drei Mal auf den Selektionsplatten gereinigt und nochmals auf den Phänotyp hin untersucht.

2.5.4 Inverse PCR

Zur Identifikation der Gene, die eine *Tn10* Insertion tragen, wurde u.a. die Technik der Inversen PCR durchgeführt (Higashitani et al., 1994). Dies ist die Amlifikation von unbekannt Sequenzen, die links und rechts einer Bekannten, in diesem Falle der IS-Elemente des Transposons, liegen.

Dafür wurde ca. 0,5µg chromosomaler DNA der Mutanten über Nacht mit *Sau3a* verdaut und die so erhaltenen Fragmente wieder religiert. Dafür muß die DNA Konzentration jedoch stark verdünnt vorliegen (10fach), so daß die Fragmente vorzugsweise mit sich selbst ligieren. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschliessender Ethanol-Präzipitation werden die nun ringförmigen DNA-Stücke als Template für eine erste PCR verwendet. Die Primer #ah1 und #ah2 (Higashitani et al., 1994), die dazu benutzt werden, sind so orientiert, daß man von beiden Seiten aus dem Transposon heraus liest. Die Bindestelle ist im Bereich der *IS10* lokalisiert. Man bekommt ein Produkt, dessen innere Region aus unbekannter Sequenz, flankiert von den bekannten IS-Elementen, besteht. Das PCR-Programm war wie folgt aufgliedert:

1 Zyklus	4,0 min 94°C
30 Zyklen	0,5 min 94°C
	1,5 min 56°C
	2,0 min 72°C
1 Zyklus	5,0 min 72°C

Die PCR-Fragmente wurden daraufhin in einem Agarosegel aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten, eluiert und einer zweiten PCR unterzogen. Um die Spezifität der Primerbindung zu erhöhen, wurde dieses Mal ein Programm mit 8 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 58°C und nur 20 Zyklen bei den oben erwähnten 56°C angewendet.

2.5.5 Plasmidkonstruktionen

Alle für diese Arbeit wichtigen Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Zur Klonierung von *purK* wurde das Gen mit Hilfe von flankierenden Primern (5'-AAGTCGACATGAAACAGGTTTGCGT-3') und (5'-CCCAAGCTTGATTAACCG AACTTACTCTGCG-3') aus chromosomaler wildtyp DNA amplifiziert. Nach Verdau des erhaltenen Fragments mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *SalI* wurde das 1088bp lange DNA-Stück in den mit den gleichen Enzymen behandelten Vektor pTrc99A ligiert. Das resultierende Plasmid pPurK trägt nun das Gen *purK* unter Kontrolle des induzierbaren *tac*-Promotors.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die von Laemmli (1970) beschriebene SDS-Gelelektrophorese beruht auf der Tatsache, daß denaturierte Proteine in Anwesenheit von SDS abhängig von ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen. Aufgrund dieser Methode können verschiedene Proteine voneinander getrennt und nach einer Färbung mit Coomassie ihrer Größe entsprechend sichtbar gemacht werden. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde jeweils ein Proteinstandard (Pharmacia, BioRad) mit aufgetragen. Bei Ganzzellextrakt wurde 1ml einer Kultur mit OD₅₇₈ von 1 abzentrifugiert und das Pellet in 100µl einfach Probenpuffer aufgenommen. Davon wurde standardmäßig 20-30µl aufgetragen.

2.6.2 Western Blot

Zum Nachweis von Proteinen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern verwendet man die Methode des „Western Blots“ (Sambrook et al., 1989). Hierzu wurden zuvor über ein SDS-Gel aufgetrennte Proteine elektrophoretisch auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF von Pall mit einer Porengröße von 0,2µm) transferiert. Der primäre Antikörper wurde im Falle des gereinigten CRP-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:100, ansonsten 1:1000 in TBSTM-Puffer (20mM Tris-HCl pH7,5; 150mM NaCl;

0,05% Tween-20; 5% Milchpulver) eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde ein Ziege-Anti-Kaninchen IgG-Konjugat mit alkalischer Phosphatase (Sigma) im Fall der CRP-Versuche; mit Peroxidase (Pierce) bei der Determination von EIIA^{Glc}, verwendet.

2.6.3 CRP-Reinigung

CRP wurde aus dem *E. coli* Stamm MC4100/ pDCRP anhand einer cAMP-Affinitätschromatographie isoliert. Dafür wurde ein halber Liter einer bei 37°C gewachsenen LB Amp-Übernachtskultur abzentrifugiert (4.200g für 20 min bei 4°C). Das Pellet wurde gewaschen und in 4 ml Lysepuffer I (50mM Kaliumphosphatpuffer pH7,5; 2mM EDTA; 0,2M NaCl; 5% Glycerin; 1mM DTT) aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels French Press Verfahren (American Instrument Company). Nach zwei weiteren 30minütigen Zentrifugationsschritten bei 19.000g wurde der von unlöslichen Zellbestandteilen nun freie Überstand auf die zuvor mit Lysepuffer I äquilibrierte 2ml cAMP-Agarose-Säule (Sigma) aufgetragen. Gewaschen wurde mit 12ml Waschpuffer (500mM Kaliumphosphatpuffer pH7,5; 2mM EDTA; 5% Glycerin; 1mM DTT) und 2ml Lysepuffer II (Lysepuffer I ohne NaCl). Die Elution des schon nahezu reinen CRP erfolgte mit Elutionspuffer (Lysepuffer I mit 5mM cAMP) in acht 1ml Schritten. Zur Konzentrationsbestimmung der Fraktionen wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) angewandt, wobei die Protein-Assay-Lösung der Firma BioRad laut Herstellerangaben verwendet wurde. Die Reinheit wurde anhand SDS-Gelelektrophorese ermittelt. Nur die reinsten und konzentriertesten Fraktionen wurden dann einer zu 85% gesättigten Ammoniumsulfatfällung unterzogen und durch Zentrifugation (19.000g; 30 min; 4°C) geklärt. Das Präzipitat wurde anschliessend in 100µl Konservierungspuffer I (10mM Kaliumphosphatpuffer pH6,8; 0,1M NaCl; 10% Glycerin) resuspendiert und je zwei Mal gegen 1l des gleichen Puffers, sowie gegen Konservierungspuffer II (Konservierungspuffer I mit 50% Glycerin), dialysiert. Diese Methode entstammt in abgewandelter Form der Vorschrift von Ghosaini et al. (1988).

2.6.4 Antikörperreinigung nach der Immunoblotting Technik nach Olmsted (1981)

Um antigenspezifische Antikörper zu bekommen wurde gereinigtes CRP auf PVDF (Polyvinyliden Difluorid) Membran geblottet und mit Ponceau (eine 0,04% Lösung in 10%iger Essigsäure) angefärbt. Dieser Streifen der nun das Protein enthält wurde ausgeschnitten und mit TBSTM (20mM Tris pH7,5; 150mM NaCl; 0,05% Tween-20; 5% Milchpulver) geblockt. Der Streifen wurde mit polyklonalem Antikörper gegen CRP, der im Kaninchen gewonnen wurde, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Elution mit 50mM Tris; 200mM Glycin pH2,6. Neutralisiert wurde die Lösung mit 1M Tris Base im Volumen 1/10.

2.6.5 Herstellung von Zellextrakten für 2D-Gelelektrophorese Analysen

Für die 2D-Gelelektrophorese Analysen lies man den Stamm MC4100 in 500ml TB mit und ohne 0,4% Glycerin bei 37°C wachsen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, zwei Mal in TE-PMSF (10mM Tris pH7,5; 1mM EDTA; 0,3mg/ml PMSF) gewaschen und das Pellet in 2-3ml TE-PMSF resuspendiert. Nach dreimaliger Passage durch die French Press erfolgte ein 10minütiger Zentrifugationsschritt bei 10.000g und ein einstündiger bei 100.000g. Von dem so erhaltenen Extrakt wurde die Proteinkonzentration bestimmt bevor es bei -70°C eingefroren wurde. Die darauffolgenden 2D-Gelelektrophorese-Analysen und MALDI-Experimente wurden im Labor von Dr. U. Völker durchgeführt.

2.6.6 Determination des Phosphorylierungsgrads von Enzym IIA^{Glc}

Die zu testenden Stämme wurde in mit MMA gepuffertem TB 1:100 angeimpft und wuchsen dann mit oder ohne Glycerin bzw. G3P bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 bei 37°C. Zu 20µl 10M NaOH gab man 0,2ml der Zellen und vortexte 10 sec. Nach Zugabe von 1ml eiskaltem Ethanol (98%) und 180µl 3M Natriumacetat (pH5,2) wurden die Proben mindestens 10min bei -70°C eingefroren. Dieser Schritt muß sehr schnell und auf Eis ausgeführt werden. Das nach einer Zentrifugation bei 4°C (10 min bei 13.000rpm in einer Eppendorffzentrifuge) erhaltene Pellet wurde mit 70%igem, eiskaltem Ethanol gewaschen und in 200µl einfach Auftragspuffer aufgenommen. Auf ein 15% SDS-Gel trug man 10µl der 5 min bei 95°C gekochten Proben auf. Die aufgetrennten Proben wurden elektrophoretisch auf eine PVDF Membran transferiert und der Blot dann mit

polyklonalem Anti-EIIA^{Glc} Antikörper inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase gekopplerter Antikörper gegen Kaninchen (Pierce) verwendet. Für die Detektion kam ein ECL-Farbstoff von Pierce (Super Signal) nach Herstelleranweisung zur Anwendung. Diese Methode wurde von Takahashi et al. (1998) und Hogema et al. (1998) veröffentlicht.

2.6.7 Fluoreszenzphotospektroskopie

Die Bindung von cAMP an CRP wurde anhand der Tryptophanfluoreszenz bestimmt. Die Änderung der Tryptophanfluoreszenz von CRP wurde entsprechend der Methode nach Heyduk & Lee (1989) durchgeführt.

Eine Lösung von 10µg/ml CRP in 100mM Tris-HCl pH7,5 wurde bei 20°C mit 1-2µl konzentrierten cAMP (Tris Salz; Sigma) titriert. Die Wellenlänge der Fluoreszenzemission wurde auf 343nm gesetzt, angeregt wurde bei 300nm. Diese aus der Literatur ermittelten Daten wurde anhand von Anregungsspektren nochmals kontrolliert. Die Proteinverdünnung, die durch die Volumensänderung bei Zugabe des cAMP auftrat wurde durch Wasserzugabe der gleichen Volumina bestimmt und korrigiert. Ausserdem wurde der Fehler ermittelt, der durch den inneren Filtereffekt des cAMPs bedingt ist. Hierzu wurde BSA, das nicht befähigt ist cAMP zu binden, unter identischen Bedingungen mit cAMP titriert. Für die Messungen mit G3P wurde CRP mit G3P in einer Endkonzentration von 10mM vorinkubiert.

Die ermittelten Daten wurden als relative Änderung der Fluoreszenz ($\Delta F/F_0$) gegen die cAMP-Konzentration aufgetragen.

2.6.8 β -Galaktosidase Assays von *lacZ* Fusionsstämmen

Diese Aktivitätsbestimmung von *lacZ* Fusionsproteinen nach Miller (1972) beruht auf der Tatsache, daß das Enzym β -Galaktosidase außer seinem natürlichen Substrat auch ONPG (Ortho-Nitrophenyl- β -Galaktopyranosid) hydrolisieren kann. Dabei entsteht aus dem farblosen Substrat Galaktose und Ortho-Nitrophenol zu je gleichen Teilen. Letzteres ist ein gelber Farbstoff, dessen Menge photometrisch durch seine Absorption im Bereich von 405nm quantifiziert werden kann.

Für diesen Test wurden 18h gewachsene Übernachtskulturen abzentrifugiert (die Zellmenge wurde hierbei nach der Aktivität der zu messenden *lacZ* Fusion ausgewählt.), in 1ml Z-Puffer pH 7 (Pro Liter: 16,1g Na₂HPO₄; 5,5g NaH₂PO₄; 0,75g KCl; 0,246g

MgSO₄) resuspendiert und die OD₅₇₈ gemessen. Zu Aliquots von 800µl wurden je zwei Tropfen 0,1% SDS und Chloroform zur Permeabilisierung der Zellen gegeben und 10sec gründlich gemischt. Nach 10min bei RT wurde die Reaktion mit 140µl ONPG (4mg/ml) gestartet und nach Gelbfärbung mit 400µl 1M NaCO₃ abgestoppt. Danach wurden die Zellfragmente abzentrifugiert und der Überstand bei 405nm gemessen. Zur Bestimmung der Aktivität wurde folgende Formel benutzt:

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{\text{OD}_{405} \times V_{\text{total}} \times 1000}{\epsilon_{\text{ONPG}} \times \text{Dt} \times V_{\text{Aliquot}} \times \text{OD}_{578} \times 0,107} \quad [\mu\text{mol Substrat}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}]$$

V_{total} := Gesamtvolumen

V_{Aliquot} := eingesetztes Volumen

ϵ_{ONPG} := Extinktionskoeffizient von Ortho-Nitrophenol (ϵ entspricht bei 405nm $4860\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Dt := Reaktionszeit bis zur Gelbfärbung

Nach Miller entspricht der Proteingehalt einer Kultur mit einer OD₅₇₈ von 1 dem Wert 0,107mg / ml.

Alle β -Galaktosidase Aktivitäten wurden mehrere Male mit voneinander unabhängigen Kulturen in Doppelbestimmungen ermittelt und davon ein Mittelwert errechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Die zwei verschiedenen Ebenen der *malT* Regulation

3.1.1 Vergleich transkriptionaler und translationaler *malT-lacZ* bzw. *malK-lacZ* Fusionen hinsichtlich der Rolle von Enzym IIA^{Glc} beim Glycerineffekt

Wie in der Einleitung erläutert, ist die Komponente des PEP-abhängigen Phosphotransferase Systems, Enzym IIA^{Glc}, ein wichtiger Vermittler der klassischen Katabolitrepression. Obwohl Glycerin PTS-unabhängig transportiert wird, ist es bei der Untersuchung des Glycerineffekts wichtig, die mögliche Beteiligung dieser Komponente in Betracht zu ziehen. Es ist bekannt, dass EIIA^{Glc} die Fähigkeit besitzt die Aktivität der Adenylatcyclase zu modulieren. Somit übt sie Einfluss auf katabole Systeme, wie das Maltosesystem, aus. Um zu klären, ob EIIA^{Glc} für die Glycerin-abhängige Repression wichtig ist, wurde das Gen *crr* in verschiedenen Teststämmen deletiert. In Tabelle 5 sind die spezifischen β -Galaktosidase Aktivitäten von transkriptionalen und translationalen *malT-lacZ* bzw. *malK-lacZ* Fusionen zusammengefasst. Im Falle einer transkriptionalen oder Operonfusion besitzt das fusionierte Reportergen *lacZ* seine eigene Translationskontrollregion, der eigene Promotor fehlt hingegen. Ist nun der gemeinsame Promotor aktiv, so werden beide Gene zusammen transkribiert. Die Translation läuft aber unabhängig voneinander ab. Durch diese Technik kann Transkriptionsregulation untersucht werden. Fehlt nun neben dem Promotor auch noch die Ribosomenbindestelle, sowie das Startcodon von *lacZ*, entsteht beim Ablesen ein Hybridprotein. Diese Fusion wird translationale oder Proteinfusion genannt. Sie reflektiert die Summe der transkriptionalen und translationalen Regulation. Ein Vergleich dieser beiden Fusionstypen gibt Aufschluss über die Ebene in der die Regulation des Zielgens stattfindet.

Betrachtet man sich in Tabelle 5 die Aktivitäten der transkriptionalen (Bre1161) und der translationalen (POP3506) *malT-lacZ* Fusionen, so zeigt sich die bekannte Repression durch Glycerin um den Faktor 5 bzw. 8. Bei den entsprechendem EIIA^{Glc} Deletionsmutanten (Δcrr) fällt aber auf, dass nur die translationale Fusion (ET127) eine Erniedrigung der β -Galaktosidase Aktivität zeigt. Es gibt demzufolge neben der EIIA^{Glc}-abhängigen Repression der *malT* Transkription, eine weitere unabhängige posttranskriptionale Regulationsebene. Hingegen zeigen alle vier Stämme, die eine *malK-lacZ* Fusion tragen einen Glycerineffekt. Dies bestätigt den früheren Befund, dass *malT*

das Ziel dieses Phänomens ist. Da MalT Einfluss auf alle anderen Gene des *mal*-Regulons hat, sieht man eine postranskriptionale Repression auch auf eine indirekt Art und Weise auf der Ebene der Transkription.

Tabelle 5: Der Einfluss von Glycerin auf Δ *crr* Mutanten

Stämme	Fusion	Relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
			TB	TB Glyc
Bre1161	<i>malT-lacZ</i> ¹⁾		0.36	0.07
ET126	<i>malT-lacZ</i> ¹⁾	Δ <i>crr</i>	0.08	0.07
POP3506	<i>malT-lacZ</i> ²⁾		0.08	0.01
ET127	<i>malT-lacZ</i> ²⁾	Δ <i>crr</i>	0.03	0.01
Bre1162	<i>malK-lacZ</i> ¹⁾		0.87	0.26
ET128	<i>malK-lacZ</i> ¹⁾	Δ <i>crr</i>	0.07	0.005
HS3084	<i>malK</i> ⁺ - <i>lacZ</i> ²⁾		0.21	0.02
ET125	<i>malK</i> ⁺ - <i>lacZ</i> ²⁾	Δ <i>crr</i>	0.02	0.003

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens drei unabhängigen Übernachtskulturen. Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min} \cdot \text{mg Protein}$ angegeben. Die Stämme wuchsen in TB und TB + 0,4% Glycerin bei 37°C.

1) transkriptionale Fusion

2) translationale Fusion

3.1.2 Die Rolle der Adenylatcyclase

In *E. coli* spielt der cAMP/CRP-Komplex als globaler Regulator eine wichtige Rolle. Er ist nicht nur Transkriptionsaktivator vieler Gene, sondern auch das Ziel des durch EIIA^{Glc} vermittelten Glucoseeffekts. Der Regulationsmechanismus ist die Modulation der Adenylatcyclaseaktivität. Die Aktivitätserniedrigung dieses wichtigen Enzyms in Anwesenheit eines PTS Zuckers ermöglicht einen Einfluss auf die verschiedensten metabolischen Systeme (siehe dazu Kapitel 1.7.2). Im nächsten Experiment wurde daher nach einer möglichen Beteiligung der Adenylatcyclase gefragt.

Dafür wurde die Expressionsänderung beider *malt-lacZ* Fusionen im Wildtyp und in einer Adenylatcyclasemutante in Anwesenheit von Glycerin und eines weiteren Nicht-PTS Kohlenstoffes, Xylose, bestimmt. Die Adenylatcyclasemutante besitzt außer einer Deletion in dem zu untersuchenden Gen *cya* noch eine *crp** Mutation. Diese Mutation befähigt CRP auch ohne cAMP als Transkriptionsaktivator aktiv zu sein. Tabelle 6 zeigt die entsprechenden Werte der Aktivitäten der transkriptionalen (Bre1161) und translationalen (POP3506) *malt-lacZ* Fusionen.

Tabelle 6: Der Einfluss einer Δcya *crp Mutation auf die Expression von *malt-lacZ* Fusionen**

Stämme	relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität		
		TB	TB Glyc	TB Xyl
Bre1161 ¹⁾		0,51	0,18	0,10
ET24 ¹⁾	Δcya <i>crp*</i>	0,32	0,29	0,39
POP3506 ²⁾		0,15	0,03	0,01
ET25 ²⁾	Δcya <i>crp*</i>	0,09	0,03	0,02

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens drei unabhängigen Übernachtkulturen. Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min} \cdot \text{mg Protein}$ angegeben. Die Stämme wuchsen in TB und TB + 0,4% Glycerin bei 37°C.

1) transkriptionale Fusion

2) translationale Fusion

Es ist zu sehen, dass die Wildtypstämme beide durch Glycerin bzw. Xylose 3 bis 5fach reprimiert werden. Während die transkriptionale Fusion ohne Adenylatcyclase (ET24) keine Repression mehr zeigte, reagierte das translationale *malt-lacZ* (ET25) auf die Zugabe der Nicht-PTS Kohlenstoffquellen. Hier sank die Aktivität von 0,09 auf den Wert 0,03 respektive 0,02 $\mu\text{mol/min} \cdot \text{mg}$. Der Einfluss auf die Transkription von *malt* ist demnach außer von EIIA^{Glc} auch von cAMP abhängig, jedoch nicht die posttranskriptionale Ebene. Dieser Mechanismus scheint außerdem für Nicht-PTS Zucker allgemeingültig zu sein.

3.2 Untersuchungen zur transkriptionalen Regulationsebene

3.2.1 CRP ist nicht das direkte Ziel von G3P

CRP spielt zusammen mit cAMP eine Schlüsselrolle in der Regulation der Transkription von Katabolitrepressions-sensitiven Genen. Die Bindung von cAMP an sein Rezeptorprotein geht mit einer Konformationsänderung einher, die den Komplex befähigt spezifisch an DNA zu binden (McKay & Streitz, 1981; Weber & Streitz, 1987; Ebright et al., 1984). Die Überlegung zur Aufklärung der transkriptionalen Repression durch G3P war, dass G3P oder andere phosphorylierte Kohlenhydrate mit geringer Affinität an CRP binden. Auf diesem Weg könnte die Aktivierung von CRP durch cAMP allosterisch oder kompetitiv gehemmt werden. Um die Bildung eines cAMP/CRP-Komplexes zu verhindern gibt es zwei Möglichkeiten: Erstens könnte G3P mit cAMP um die cAMP-Bindestelle konkurrieren, indem es direkt am N-Terminus des Proteins bindet. Oder zweitens, G3P interagiert an einer anderen Stelle mit CRP und verhindert indirekt, z.B. über eine Konformationsänderung, die Bindung von cAMP an das Protein oder dessen Aktivierung.

Besitzt ein Protein Tryptophanreste, wie es für CRP zutrifft, können solche Veränderungen der Struktur anhand der Tryptophanfluoreszenzspektroskopie ermittelt werden. Tryptophanreste in einem Protein sind zur Fluoreszenzemission befähigt, wenn sie mit Licht hoher Energie, also geringer Wellenlänge, angeregt werden. Diese Methode wurde zur Untersuchung der cAMP/CRP-Interaktion schon mehrmals eingesetzt (Heyduk & Lee, 1989). Wenn CRP mit steigenden cAMP-Konzentrationen titriert und mit einer Wellenlänge von 300nm angeregt wird, steigt die Intensität der Fluoreszenz der Tryptophanreste an.

Dies wird in Abbildung 3 (Dreiecke mit durchgezogener Linie) in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen gezeigt (Heyduk & Lee, 1989). Jedoch kann diese Methode nur mit cAMP-Konzentrationen im millimolaren Bereich durchgeführt werden. Die Präinkubation von CRP mit 10mM G3P bewirkte in diesem Versuch jedoch, wie die Werte (Vierecke mit gestrichelter Linie) in Abbildung 4 zeigen, keinen signifikant großen Unterschied in der Fluoreszenz. Eine Kompetition von G3P mit cAMP ist daher unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen. Eine Bindung von G3P an CRP konnte anhand der Fluoreszenzmessungen ebenfalls nicht festgestellt werden, da die Zugabe von G3P zu gereinigtem CRP das Fluoreszenzemissionsspektrum nicht veränderte (Daten nicht gezeigt).

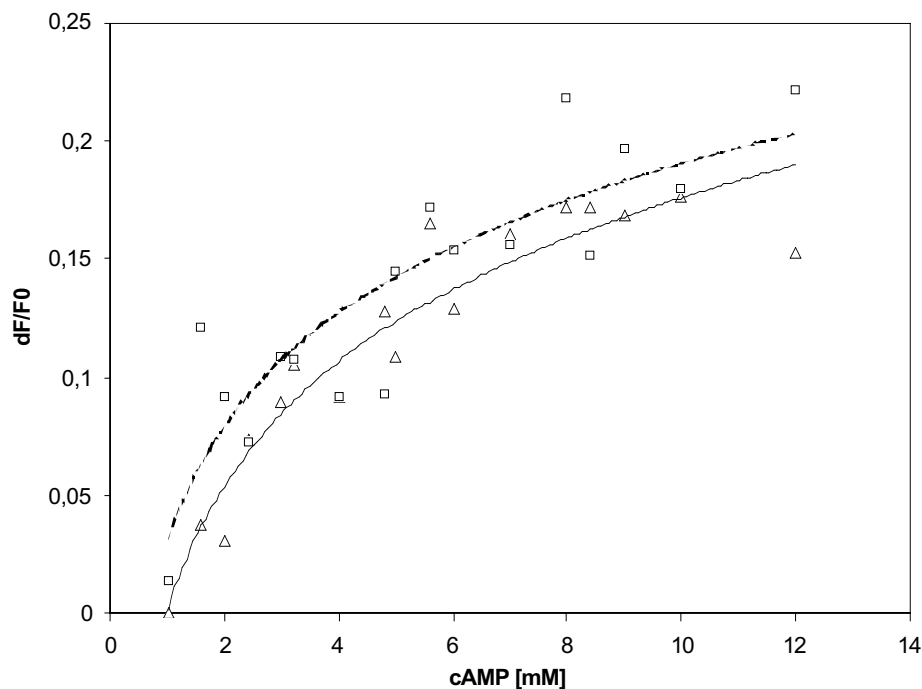


Abbildung 3: Die Fluoreszenz der Tryptophanreste von CRP als Funktion der cAMP-Konzentration

Die relative Fluoreszenzänderung wurde als dF/F_0 angegeben (Ordinate). dF ist der Unterschied der Fluoreszenzemission in An- und Abwesenheit von cAMP und F_0 die Fluoreszenz des freien Proteins. Die Abszisse gibt die cAMP-Konzentration an. Die Dreiecke (durchgezogene Linie) stehen für die Werte der cAMP abhängigen Fluoreszenzänderung; mit den Vierecken (gestrichelte Linie) sind die Ergebnisse mit CRP, das mit 10mM G3P vorinkubiert wurde, angegeben.

3.2.2 Die Repression ist unabhängig von der CRP-Menge in der Zelle

Für die klassische Katabolitrepression bestand lange Zeit die Vorstellung, dass die Regulation der cAMP/CRP-Konzentration nur über die Adenylatcyclase Aktivität gesteuert wird. Doch neuere Hypothesen stellen dies in Frage und besagen, dass auch die CRP-Menge durch z.B. Glucose beeinflusst wird (Ishizuka et al., 1993, 1994).

Um zu testen, ob G3P eine Reduktion des CRP-Spiegels bewirkt wurde in einem Western Blot die Menge an CRP in einem Stamm (HS3084) bestimmt, der zum einen in TB zum andern in TB mit 0,4% Glycerin gewachsen ist. Dafür wurden gereinigte anti-CRP Antikörper verwendet. In dem Western Blot der Abbildung 4 ist in der ersten Spur

als Kontrolle ein *crp* Deletionsstamm, in den beiden folgenden Spuren der Stamm HS3084 aufgetragen. Im Vergleich der beiden CRP-Mengen des TB (Abb. 4A; Spur 2) und des TB Glycerin-Ansatzes (Abb. 4A; Spur 3) sieht man keinen nennenswerten Unterschied. Allerdings konnte die in den Arbeiten von Ishizuka et al. (1993, 1994) beschriebene Abnahme mit Glucose ebenfalls nicht signifikant nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

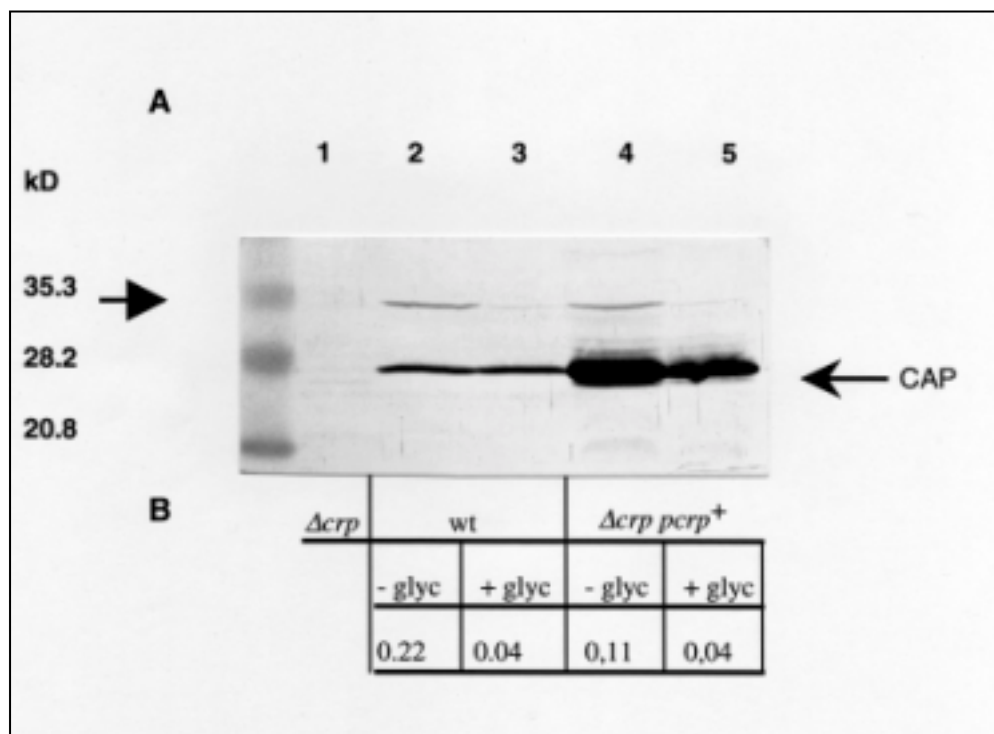


Abbildung 4 : Einfluss der CRP-Menge auf den Glycerineffekt

Es wurden folgende Stämme benutzt: HS3084 *Δcrp* Stamm (Spur 1); HS3084 in TB (Spur 2) und TB Glyc (Spur 3); HS3084 *Δcrp/pDCRP* in TB (Spur 4) und in TB Glyc (Spur 5). CAP entspricht CRP.

A. Western Blot Analyse des CRP-Spiegels in der Zelle.

B. Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (in $\mu\text{mol Substart/ min}^* \text{mg Protein}$ angegeben)

Bei besserer Auftrennung der Proteine in einem 2D-Gel war allerdings eine geringe Abnahme in Anwesenheit von Glycerin zu erkennen (Abb. 5). Zur weiteren Klärung wurde die spezifische β -Galaktosidase Aktivität der *malk⁺-lacZ* Fusion des Stammes HS3084 *Δcrp/pDCRP* bestimmt. Dieser Stamm besitzt neben einer Deletion in *crp*, ein Plasmid (pDCRP), welches das Gen *crp* unter der Kontrolle seines eigenen Promotors trägt. Auf diese Weise konnte die CRP-Konzentration der Zelle stark gesteigert werden, wie in Abbildung 4A; (Spur 4 TB; Spur 5 TB/ Glyc) gut zu sehen ist. Trotz der großen Mengen bewirkte dies jedoch keine Aufhebung der Repression durch Glycerin (Abb.

4B). Dies müsste man fordern, wenn der Glycerineffekt über den CRP-Spiegel bestimmt werden würde.

Da die *cya* Expression bei einer Überexpression von CRP reprimiert (Aiba, 1985; Mori & Aiba, 1985) und die Adenylatcyclase Aktivität durch CRP negativ beeinflusst wird (Review Botsford & Harman, 1992), führen die großen CRP-Mengen zu einer Erniedrigung des cAMP-Levels. Dies hat wiederum Auswirkungen auf die Transkription von *crp* (Hanamura & Aiba, 1991) und anderen Genen, wie z. B. *malt* bzw. *malK*. Die Folgen dieses Autoregulationsloops spiegeln sich in der etwas niedrigeren β -Galaktosidaseaktivität bei Erhöhung der CRP-Menge wider. Eine Zugabe von cAMP ins Medium würde dieses Phänomen wahrscheinlich aufheben, war aber nicht möglich, da dies wachstumshemmend für die Zellen ist (Hogema et al., 1997). Bei der Überexpression von CRP fällt desweiteren auf, dass die Proteinkonzentration in Anwesenheit von Glycerin (Vergleich von Spur 4 mit 5) etwas reduziert ist. Die Erklärung liegt wohl auch hier im Autoregulationsloop und der Tatsache, dass Glycerin die cAMP-Menge noch mehr senkt.

Darüberhinaus zeigt der gereinigte anti-CRP Antikörper eine Kreuzreaktion mit einem Protein von ca. 34kD (Abb. 4 mit Pfeil gekennzeichnet). Dies schien interessant zu sein, weil die detektierte Proteinmenge in Anwesenheit von Glycerin, aber auch Xylose (Daten nicht gezeigt), deutlich reduziert schien. Da die Bande in der Kontrolle (Δcrp) nicht auftritt, muss man davon ausgehen, dass es sich um ein cAMP/CRP-abhängiges Genprodukt handelt.

In Zusammenarbeit mit Dr. U. Völker aus Marburg wurde dieses Protein in einer 2D-Gelelektrophorese mit anschließender Western Blot Analyse untersucht. Durch den Vergleich der Membranen, die zum einen mit anti-CRP Antikörpern (Abb. 5B/D), zum anderen mit Tinte behandelt wurden (Abb. 5A/C), konnte eine genaue Lokalisierung erfolgen. Dabei fiel auf, dass die Zellen, die in Glycerin wuchsen grössere Mengen dieses Proteins (X) enthielten. Allerdings schien der Antikörper im Western Blot der Glycerin Kultur deutlich weniger stark mit dem Protein zu reagieren. Über die Gründe dieses Phänomens kann nur spekuliert werden. Eine Erklärung könnte in einer Glycerin-abhängigen Modifikation des unbekanntes Proteins liegen, die zu einer Verschlechterung der Antigenerkennung durch den Antikörper führt. Das Protein X wurde als Genprodukt von *yeaD* identifiziert. *yeaD* liegt distal zu *gapA*, dem Gen für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, bei 40,2 min des *E. coli* Genoms. GapA ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse und der Gluconeogenese und wandelt Glyceraldehyd-3-Phosphat in 1,3-Diphosphoglycerat um. Es besteht die Möglichkeit, dass *gapA* und *yeaD* zusammen ein Operon bilden. Die Promotorregion vor *gapA* ist komplex aufgebaut. Sie besteht aus vier Promotorsequenzen, wovon drei durch den $E\sigma^{70}$ und eine

durch den $E\sigma^{32}$ RNA-Polymerase Komplex erkannt werden (Charpentier & Branlant, 1994). Mit Hilfe der NCBI Datenbank konnte auch stromaufwärts von *yeaD* ein schwacher σ^{70} -abhängiger Promotor gefunden werden. Die Promotorsequenz liegt im codierenden Bereich von *gapA*. *yeaD* codiert für ein 301 Aminosäuren großes Peptid unbekannter Funktion. Dieses 32,7kD Protein ist hoch homolog zu Mutarotasen und gehört daher zur UPF0010 Familie. Ein Homologievergleich erbrachte 35% identische Aminosäuren zu einer möglichen Mutarotase (VC2001) in *Vibrio cholerae*. Das Gen VC2001 liegt auf dem Chromosom I und ist wiederum hinter dem Gen (VC2000) für eine Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase lokalisiert. Außerdem gibt es noch eine Reihe weiterer hypothetischer Mutarotasen mit Homologie zu YeaD, wie HI1317 von *Haemophilus influenzae* (mit 34% identische Aminosäuren) oder PM0711 von *Pasteurella multocida* (mit 35% identischen Aminosäuren). Alle diese möglichen Mutarotasen haben zwei hoch konservierte Domänen gemeinsam. Sie liegen in YeaD zwischen Aminosäure 79 und 92 bzw. 169 und 179.

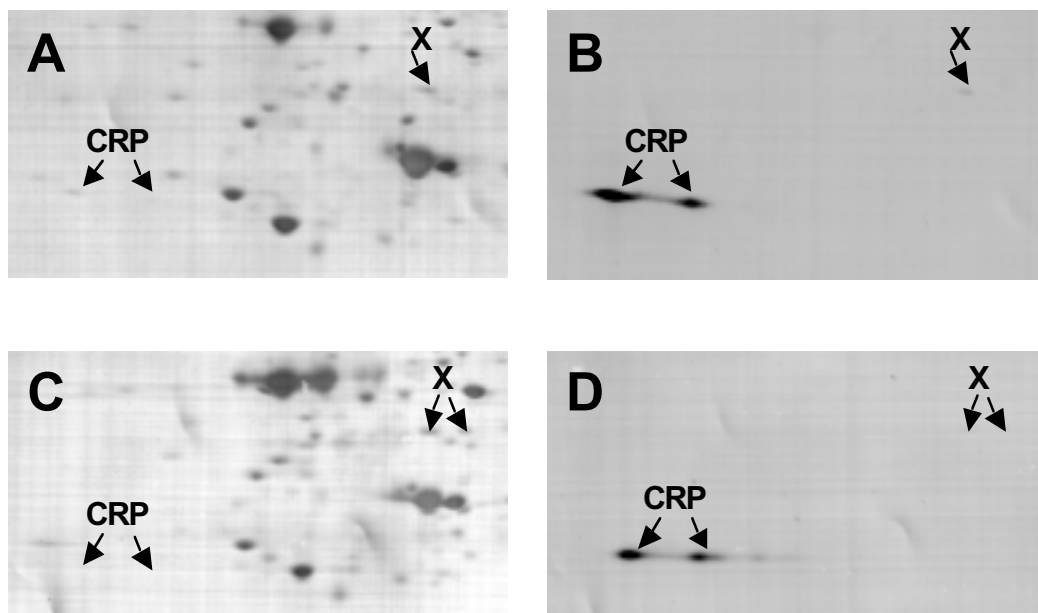


Abbildung 5: Lokalisierung des 34kD-Proteins

Der Zellextrakt einer TB (Bild A und B) und TB/ Glycerin (Bild C und D) Übernachtskultur des Stammes MC4100 wurde wie in Material und Methoden beschrieben behandelt. Die Proteine wurden durch eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf PVDF Membranen gebロットet und jeweils mit Tinte gefärbt (Bild A und C) oder mit gereinigtem Anti-CRP Antikörper behandelt (Bild B und D). Das X kennzeichnet das unbekannte Protein.

Ein weiteres interessantes Ergebnis der 2D-Gel Untersuchung war die Abnahme der CRP-Menge in Anwesenheit von Glycerin. Hier konnte man, aufgrund der besseren Auftrennung, ähnlich der Ergebnisse im CRP Überexpressionsstamm (Abb. 4A), die Folgen der Autoregulation sehen.

Ebenfalls wird deutlich, dass der verwendete anti-CRP Antikörper hochspezifisch für CRP ist und schon bei geringsten Mengen, die auf der mit Tinte gefärbten Membran kaum sichtbar sind (siehe Abb. 5A/C), im Western Blot ein deutliches Signal gibt (siehe Abb. 5B/D)

3.2.3 CRP ist essentiell für die transkriptionale Repression

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, ist der Mechanismus des Glycerineffekts unabhängig von der Menge an CRP. Trotzdem muss überprüft werden, ob das Protein für die transkriptionale Regulation durch Glycerin gebraucht wird. Mit Hilfe eines cAMP/CRP unabhängigen *malt* Promotors konnte dies untersucht werden. Die zwei Mutationen, *malTp1* und *malTp10*, die in der *malt* Kontrollregion liegen, erhöhen die *malt* Expression und ermöglichen somit eine Transkription ohne den Aktivatorkomplex (Chapon, 1982; Alonzo et al., 1998). Die Expression des mutierten *malt* wurde mit Hilfe einer *lacZ* Fusion bestimmt. In Tabelle 7 sind alle Ergebnisse der Messungen dieser plasmidkodierten Fusion zusammengefasst.

Der Stamm MC4100/pGPH9260 wuchs in mit MMA gepuffertem TB Medium mit Glycerin, Xylose, G3P oder Glucose. Aber keiner dieser Zusätze konnte die Expression negativ beeinflussen, so dass man davon ausgehen muß, dass CRP für die transkriptionale Repression notwendig ist. Es fällt jedoch auf, dass die β -Galaktosidase Aktivität der *lacZ* Fusion in Anwesenheit von G3P (3,23) und Glucose (2,45) im Vergleich zur Aktivität in dem in TB gewachsenen Stamm mit 1,35 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ verhältnismäßig hoch ist.

Mit dieser cAMP/CRP unabhängigen Fusion besitzt man ein System das, wie man sieht, insensitiv gegen Nicht-PTS Kohlenstoffe ist, aber auch keinen Glucoseeffekt mehr zeigt. In dieser Situation beobachtet man eine Induktion durch Glucose, die wahrscheinlich Mlc bedingt ist. Bei diesem Protein handelt es sich um einen Repressor u.a. von *malt*. Dieser Regulator besitzt die Eigenschaft an den transportierenden Glucosetransporter zu binden und dadurch inaktiv zu werden (Lee et al., 2000 und Kapitel 1.3.2).

Tabelle 7: Die Expression einer cAMP/CRP unabhängigen *malT-lacZ*-Fusion in Anwesenheit verschiedener Zucker

Stämme	Fusion	Relevanter Genotyp	Medium	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität
MC4100/ pGPH9260	<i>malTp1 malTp10-lacZ</i>		MMA TB	1.35
			MMA TB + Glyc	1.38
			MMA TB + Xyl	1.44
			MMA TB + G3P	3.23
			MMA TB + Glc	2.45
MC4100 <i>mlc</i> / pGPH9260	<i>malTp1 malTp10-lacZ</i>	<i>mlc</i>	MMA TB	2.37
			MMA TB + Glc	2.62

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens drei unabhängigen Übernachtkulturen. Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min} \cdot \text{mg Protein}$ angegeben. Die Stämme wuchsen in MMA gepuffertem TB mit Medienzusätzen von 0,4% bzw. bei Glc von 0,2% bei einer Temperatur von 37°C.

Der Anstieg der Expression bei Wachstum auf Glucose, ist also gleichgesetzt mit dem Effekt einer *mlc* Mutation. Dies zeigen die Ergebnisse in Tabelle 7. Das Wachstum auf Glucose erhöhte die Aktivität im gleichen Maß wie eine *mlc* Mutation. Die Expression der *mlc* Mutante könnte durch Glucose auch nicht weiter erhöht werden. Der Grund der G3P Induktion blieb ungeklärt.

3.2.4 Der Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Glc} in Anwesenheit von Glycerin

Mit dem Wissen, dass das Enzym IIA^{Glc} eine Rolle bei der Repression durch Glycerin spielt, wurde nun die Frage nach dem Mechanismus gestellt. In dieser Studie wurde die Möglichkeit untersucht, dass G3P den Phosphorylierungsgrad dieser PTS Komponente beeinflusst.

Das Modell der klassischen Katabolitrepression sieht vor, dass während des Glucosetransports EIIA^{Glc} hauptsächlich in der dephosphorylierten Form vorliegt. Das phosphorylierte EIIA^{Glc}-P ist aber für die Stimulierung der Adenylatcyclase notwendig. Wird durch Glucose das Gleichgewicht des Phosphorylierungsgrads auf die Seite der unphosphorylierten Form gebracht, fällt die positive Beeinflussung der Adenylatcyclase Aktivität weg. Die Folge ist eine stark reduzierte cAMP-Synthese mit Auswirkungen auf die Expression von cAMP/CRP abhängiger Gene (siehe Kapitel 1.7.2).

Mit der von Nelson et al. entwickelten Methode gibt es eine Möglichkeit den Phosphorylierungszustand von Proteinen zu bestimmen. Hierbei wird durch Alkalibehandlung das Histidin-Phosphat stabilisiert, und die beiden Formen in einem SDS Gel elektrophoretisch voneinander getrennt (Nelson et al., 1986).

In dem folgenden Experiment wurde der Phosphorylierungsstatus von EIIA^{Glc} in Zellen bestimmt, die in TB mit oder ohne Glycerin bzw. G3P wuchsen. Hierfür wurden isogene Stämme benutzt, die verschiedene Mutationen in Genen des Glycerinstoffwechsels trugen. Abbildung 6 A zeigt den Zustand in der logarithmischen Wachstumsphase. In den ersten drei Spuren des Western Blots sind die Ansätze des Wildtypstammes in TB, TB/ Glycerin und TB/ G3P zu sehen. EIIA^{Glc} liegt bei normalen Wachstumsbedingungen in seiner phosphorylierten Form vor (Spur 1). Gab man nun eine der beiden repressorischen Substanzen ins Medium, so führte dies zu einer Dephosphorylierung, die mit Glycerin (Spur 2) relativ stark mit G3P (Spur 3) etwas schwächer ausgebildet war. Ist das *glp*-System durch eine *glpR* Mutation konstitutiv exprimiert und kann gleichzeitig durch eine fehlende aerobe Dehydrogenase (GlpD) G3P nicht weiter abgebaut werden, akkumulieren die Zellen G3P. Dies führt, wie in Spur 4-6 ersichtlich, zur Bildung von unphosphoryliertem EIIA^{Glc} auch schon ohne Zugabe von Glycerin oder G3P. Im letzten Versuch dieser Reihe wurde ein Stamm getestet, dem der Glycerin-Facilitator (GlpF) und die Glycerinkinase (GlpK) fehlen. Dies hat zur Folge, dass Glycerin zwar über Diffusion noch in die Zelle gelangt, aber nicht mehr durch GlpK zu G3P phosphoryliert werden kann. Die Auswirkung ist, dass nunmehr nur noch in Anwesenheit von G3P (Spur 9 verglichen mit Spur 7 und 8) eine EIIA^{Glc} Bande zu sehen ist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den β -Galaktosidase Aktivität dieser Stämme (Abb. 6B). Wie auch für die Repression muß für die beschriebene

Dephosphorylierung G3P in der Zelle vorhanden sein. Ein weiterer Metabolismus dieser Substanz ist nicht notwendig.

A



B

wt			<i>glpD</i>			<i>glpK</i>		
	Glyc	G3P		Glyc	G3P		Glyc	G3P
0,43	0,12	0,18	0,39	0,09	0,15	0,40	0,42	0,15

Abbildung 6 : Determination des Phosphorylierungszustands von EIIA^{Glc} in Anwesenheit von Glycerin bzw. G3P

A: Die Zellen der isogenen Stämme Bre1161, ET18 (*glpD,R*) und ET16 (*glpF,K*) wuchsen in TB (Spur 1, 4 und 7) mit 0,4% Glycerin (Spur 2, 5 und 8) oder 0,4% G3P (Spur 3, 6 und 9). Sie wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,5 geerntet und nach der Prozedur, die im Material und Methoden Teil (Kapitel 2.6.6) beschrieben wird, behandelt.

B: Spezifische β -Galaktosidase Aktivität der Stämme in $\mu\text{mol Substrat/ min} * \text{mg Protein}$. Die Werte sind der Diplomarbeit; Eppler (1997) entnommen.

Diese Beeinflussung des Verhältnisses von EIIA^{Glc} zu EIIA^{Glc}-P muss sehr schnell ablaufen. Gab man zu in TB wachsenden Zellen des Wildtyps Bre1161 zum Zeitpunkt t=0 G3P, so bemerkte man schon nach 0,5 min nach Zugabe eine geringe Bande an EIIA^{Glc}. Nach 3 und 6 min erhöhte sich die Menge etwas, um dann wieder etwas schwächer (bei 10 min) zu werden (Abb. 7A). Im zweiten Teil von Abbildung 7A wurde einem in TB/ G3P gewachsenen Stamm G3P zugegeben. Hier sieht man keine Veränderung durch zusätzliches Glycerophosphat. Die Bandenstärke ist so wie im vorangegangenen Experiment nach 10 min. Die *glpD* Mutante besitzt von Anfang an

dephosphoryliertes $EIIA^{Glc}$, welches im Laufe der Zeit oder bei nochmaliger Gabe von G3P auch nicht mehr oder weniger wird (Abb. 7B).

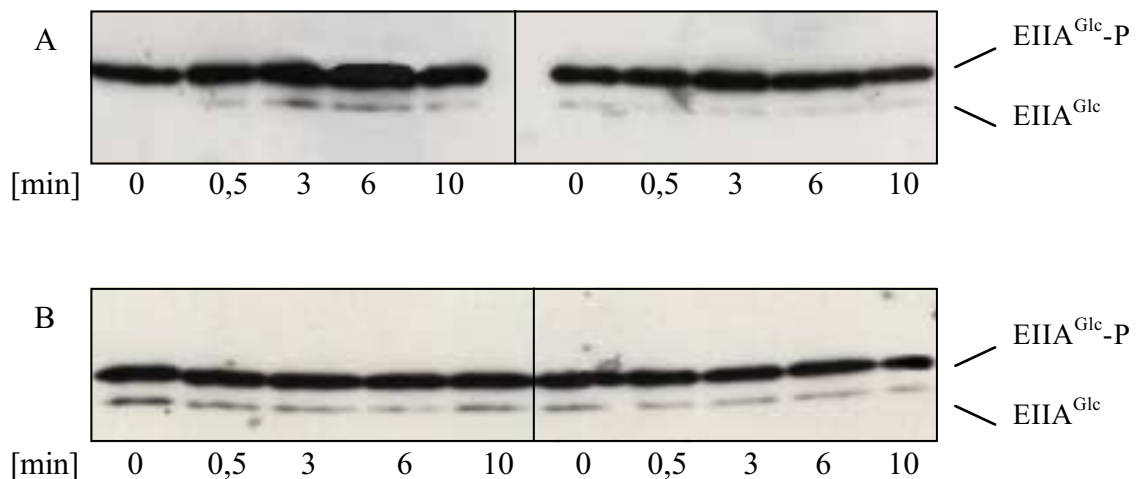


Abbildung 7: Zeitabhängige Dephosphorylierung von $EIIA^{Glc}-P$

Die isogenen Stämme Bre1161 (A), ET18 (*glpD,R*) (B) wuchsen in TB (ersten 5 Spuren) bzw. in TB mit G3P (letzten 5 Spuren). Zum Zeitpunkt $t=0$ wurde den logarithmisch wachsenden Zellen G3P in einer Endkonzentration von 10mM zugegeben. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben genommen und wie beschrieben behandelt.

3.2.5 Ist die Glycerin-abhängige Repression bedingt durch eine Titration von $EIIA^{Glc}$ durch die Glycerinkinase GlpK?

In Arbeiten von Rohwer et al. wurde beobachtet, dass unter Bedingungen, in denen das *glp*-System induziert vorliegt, der PTS Transport inhibiert ist (Rohwer et al., 1998). Dieses Phänomen liegt in der Tatsache begründet, dass übermäßige Mengen an Glycerinkinase (GlpK) das Enzym IIA^{Glc} austitrieren. Als Zielprotein der „Inducer Exclusion“ binden an ein GlpK-Tetramer vier $EIIA^{Glc}$ Moleküle (Hurley et al., 1993). Sie stehen somit nicht mehr für andere Funktionen, wie Transport oder die Regulation der Adenylatcyclase Aktivität, zur Verfügung. In vorangegangenen Experimenten (Diplomarbeit Eppler; 1997) wurde bewiesen, dass für den Glycerineffekt kein weiterer

Metabolismus ausgehend von G3P notwendig ist. Der Stamm ET18 besitzt eine *glpD*, *glpR* Mutation. Da GlpR der Repressor des *glp*-Systems darstellt, ist dieses konstitutiv induziert. Um die Frage einer möglichen Titration von EIIA^{Glc} zu beantworten, wurde in ET18 zusätzlich *glpK* ausgeschaltet. Somit ist sowohl ein Abbau von G3P ausgeschlossen, als auch der Titrationseffekt. Wie Tabelle 8 beweist, ist auch in diesem Stamm (ET160) wie in Bre1161 und ET18 ein repressorischer Effekt durch G3P zu sehen. Hingegen reprimiert Glycerin, wie erwartet, nicht mehr. Der Titrationseffekt scheint also beim Stamm ET18 nicht ausschlaggebend für den zu beobachtenden Glycerineffekt zu sein.

Tabelle 8: Spezifische β -Galaktosidase Aktivitäten von Glycerinstoffwechselmutanten

Stamm	Relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität		
		TB	TB Glyc	TB G3P
Bre1161		0,43	0,12	0,18
ET18	<i>glpD</i> , <i>glpR</i>	0,39	0,09	0,15
ET160	<i>glpD</i> , <i>glpR</i> , <i>glpK</i>	0,41	0,36	0,16

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Übernachtskulturen. Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$ angegeben. Die Stämme wuchsen in TB bei 37°C. Die Konzentration der zusätzlichen Kohlenstoffe war 0,4%.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde das Verhalten des Stammes ET18 bei einer Überexpression von EIIA^{Glc} untersucht. Das Plasmid pBCP260 trägt das *crr* Gen unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Es wurde der Effekt von G3P bei steigenden IPTG Konzentrationen in den in Tabelle 9 aufgelisteten Stämmen getestet.

Die Erhöhung des intrazellulären EIIA^{Glc}-Spiegels im Wildtypstamm Bre1161 bewirkte eine Verringerung des Repressionsfaktors von 2,4 auf 1,4 bei 30 μM IPTG. Bei dieser IPTG-Konzentration ist die höchste Induktion des Promotors erreicht (persönliche Mitteilung P. Postma). Unter diesen Bedingungen war jedoch in dem konstitutiven Stamm ET18/ pBCP260 eine Repression zu messen. Bei dem nun vorhandenen Überschuss an EIIA^{Glc} müsste aber, wenn die Titrationshypothese stimmt, der negative Effekt auf die *malt-lacZ* Expression aufgehoben sein. Zusätzlich wurde die β -

Galaktosidase Aktivität im Stamm ET16/ pBCP260 (Bre1161 *glpK,F*; *pcrr*⁺) gemessen, der das gleiche Repressionsverhalten wie die vorangegangene Mutante zeigte.

Tabelle 9: Einfluss der Überexpression von EIIA^{Glc} auf den Glycerineffekt

Stämme	relevanter Genotyp	IPTG [μ M]	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
			TB	TB G3P
Bre1161			0,43	0,18
Bre1161/ pBCP260	<i>pcrr</i> ⁺	0	0,43	0,20
		10	0,43	0,22
		30	0,37	0,27
ET18	<i>glpD, glpR</i>		0,39	0,15
ET18/ pBCP260	<i>glpD, glpR, pcrr</i> ⁺	0	0,43	0,20
		10	0,41	0,19
		30	0,36	0,19
ET16	<i>glpK, glpF</i>		0,40	0,15
ET16/ pBCP260	<i>glpK, glpF, pcrr</i> ⁺	0	0,42	0,21
		10	0,39	0,19
		30	0,38	0,18

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Übernachtskulturen. Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist in μ mol Substrat/ min * mg Protein angegeben. Die Stämme wuchsen in TB mit und ohne 0,4% G3P und IPTG bei 37°C. Die jeweiligen IPTG-Konzentrationen, zur Induktion des *tac*-Promotors, sind in der Tabelle angegeben.

Was in allen drei Ansätzen auffiel, ist ein etwas reduzierter Glycerineffekt, sobald das *crr*-Plasmid in der Zelle ist. Für dieses Phänomen scheinen schon geringe Mengen an EIIA^{Glc}, die schon im uninduzierten Zustand gebildet werden, auszureichen. Dies ist ein weiteres Indiz für die wichtige Rolle, die diese Komponente bei der Katabolitrepression durch Glycerin spielt. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Möglichkeit einer Titration von EIIA^{Glc} durch die Glycerinkinase als Erklärung für den Glycerineffekt auszuschließen ist.

3.2.6 Der Einfluss von G3P auf die Regulation der Adenylatcyclaseaktivität

Nachdem die Beteiligung der Adenylatcyclase und des Enzyms IIA^{Glc} feststand, sollte die Signaltransduktion untersucht werden. Zur Beantwortung dieser Frage diente wiederum die Modellvorstellung des Glucoseeffekts in *E. coli* als Vorlage. Hier geht man davon aus, dass $\text{EIIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ mit der Adenylatcyclase interagiert, wodurch die Aktivität des Enzyms ansteigt und somit auch der cAMP-Spiegel (Saier & Roseman, 1976). Um den Mechanismus der Interaktion, der zur Aktivitätssteigerung führt, besser verstehen zu können, wurden schon die verschiedensten Adenylatcyclase Mutanten untersucht (Crasnier & Danchin, 1990; Crasnier et al., 1994). Die Charakterisierung erlaubte die Identifizierung von Aminosäureresten, die in den Prozess der Aktivierung der Adenylatcyclase durch $\text{EIIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ involviert sind. So konnte das Enzym grob in eine N-terminale, katalytische und eine C-terminale, regulatorische Domäne eingeteilt werden (Roy et al., 1983; Holland et al., 1988). Letztere ist für die $\text{EIIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ Interaktion notwendig.

Die Frage, ob dieser Bereich auch für die Repression durch Nicht-PTS Kohlenstoffquellen wichtig ist, sollte in folgendem Experiment beantwortet werden. Hierfür wurde in den Teststamm Bre1161 ein mutiertes *cya* Allel eingebracht. Dieses Gen verfügt über ein Stopcodon an der Position 800 der Nukleinsäuresequenz und codiert für eine verkürzte Adenylatcyclase, der 48 Aminosäuren im C-Terminus fehlen (Takahashi et al., 1998). Dieses deletierte Enzym soll katalytisch noch aktiv sein, jedoch nicht mehr regulierbar. In diesem Stammhintergrund wurde durch β -Galaktosidase Assays die Auswirkung verschiedener Kohlenstoffe auf die *malt* Expression getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Die Grundaktivität der Mutante (ET190) in TB war, verglichen mit dem Wildtyp (Bre1161), um ein wesentliches kleiner. Sie lag mit einer spezifischen Aktivität von 0,16 auf dem Niveau des durch G3P und Glycerin reprimierten Bre1161. Die Zugabe dieser Kohlenstoffe zur Mutante hatte keinen Effekt im G3P und einen sehr geringen (unter Faktor 2) im Glycerin Ansatz. Die Repression durch Glucose hingegen war mit einer Abnahme der β -Galaktosidase Aktivität um das dreifache signifikant. Deletierte man in der Adenylatcyclasemutante das Gen für EIIA^{Glc} (*crr*), so sank die Grundexpression in TB nochmals. Diese nun relativ geringe Aktivität war jedoch durch keine der getesteten Zusätze veränderbar.

Tabelle 10: Rolle der regulatorischen Domäne der Adenylatcyclase beim Glycerineffekt

Stämme	Relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität			
		TB	+G3P	+Glyc	+Glc
Bre1161		0,56	0,16	0,13	0,08
ET190	<i>cya*</i> Δ (800-848)	0,16	0,16	0,09	0,05
ET196	<i>cya*</i> Δ (800-848) Δ <i>crr</i>	0,08	0,10	0,10	0,12

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Übernachtskulturen. Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min} \cdot \text{mg Protein}$ angegeben. Die Stämme wuchsen in TB bei 37°C. Die Konzentration der zusätzlichen Kohlenstoffe war 0,4% bei Glycerin und G3P und 0,2% bei Glucose.

3.3 Die posttranskriptionale Regulationsebene

3.3.1 Die Stabilität von MalT bleibt unbeeinflusst in Gegenwart von Glycerin

Außer der transkriptionalen Regulation gibt es noch einen weiteren Mechanismus der auf einer anderen Ebene eingreift. Dieser zeichnet sich durch seine cAMP und EIIA^{Glc} Unabhängigkeit aus. Auf dieser Ebene werden also auch *crr* oder Δ *cya crp** Mutanten durch Glycerin reprimiert. Wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt, kann man dies in translationalen *lacZ* Fusionen messen.

Ziel solcher Regulation kann die Translation, aber auch die Stabilität der mRNA oder des Proteins sein. So könnte es z. B. im letzteren Fall eine Protease geben, die durch G3P aktiviert, MalT abbaut. Da translationale Fusionen für Hybridproteine codieren, wäre in diesen Stämmen auch die β -Galaktosidase davon betroffen. Es müsste sich demnach der Abbau in der β -Galaktosidase Aktivität widerspiegeln. Um dies zu testen, wurde die Proteinbiosynthese in dem Stamm ET25 (POP3506 Δ *cya crp**) durch Zugabe von Chloramphenikol gehemmt und untersucht, ob die Aktivität im Laufe der Zeit in Anwesenheit von Glycerin im Wachstumsmedium schneller absinkt als im Referenzansatz ohne Glycerin.

Den Zellen wurde in der frühen logarithmischen Phase, 130 min nach dem Animpfen, das Antibiotika (0,17mg/ml) zugegeben. Zu diesem Zeitpunkt kann man normalerweise ein Glycerin-bedingtes Absinken der Expression feststellen. Das Chloramphenikol

verhindert den Peptidyltransfer in der Translation, indem es an die 50S Untereinheit der 70S Ribosomen bindet. Es wird also kein neues MalT-LacZ Protein mehr gebildet. Betrachtet man die β -Galaktosidase Aktivität in Abbildung 8, so erkennt man, dass sich nach der Hemmung der Wert sehr schnell bei einer spezifischen Aktivität von $0,42 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ einpendelte. Dies geschah sowohl beim TB als auch beim TB/ Glycerin Ansatz über lange Zeit hinweg, d.h. das Hybridprotein ist unabhängig vom Medium sehr stabil. Den Einfluss einer Protease hätte man in der gemessenen Zeit von 150 min nach Hemmung der Proteinbiosynthese aber deutlich sehen müssen. Daher ist davon auszugehen, dass die MalT-LacZ Stabilität durch Glycerin unbeeinflusst bleibt.

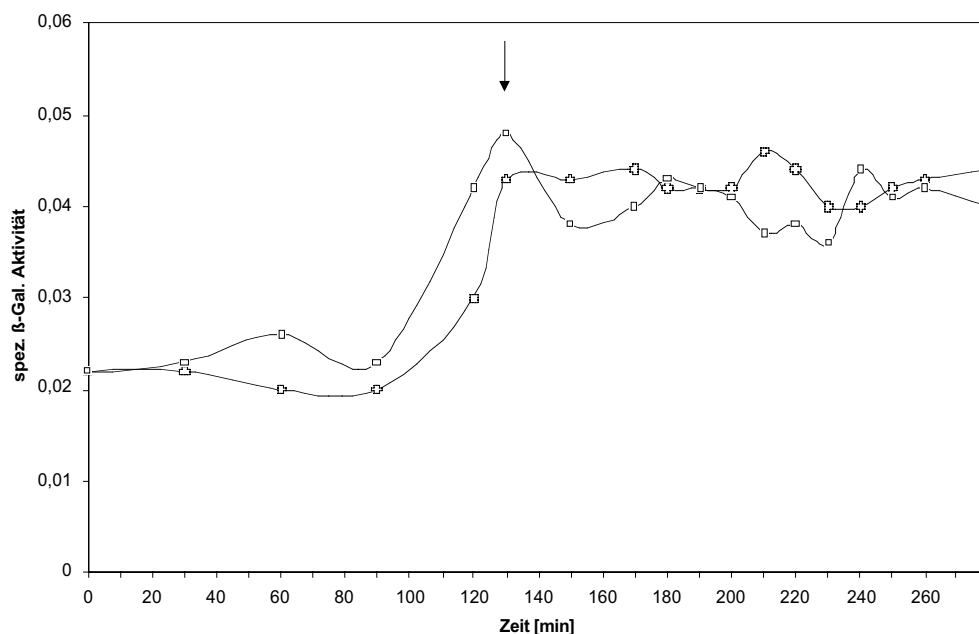


Abbildung 8: Expression einer *malT-lacZ* Fusion nach Hemmung der Proteinbiosynthese

Aus über Nacht herangezogenen Vorkulturen des Stammes POP3506 wurde ein TB (o) und ein TB Glycerin (\square) Ansatz im Verhältnis 1:50 angeimpft und bei 37°C inkubiert. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt an dem Chloramphenicol zu den Kulturen gegeben wurde. Die Abszisse gibt die Zeit in Minuten an und die Ordinate die spezifische β -Galaktosidase Aktivität in $\mu\text{mol Substrat}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$.

3.3.2 Isolierung und Charakterisierung von Mutanten, die durch Glycerin nicht mehr reprimiert werden

3.3.2.1 Vorversuche

Bevor bekannt war, dass sich der Glycerineffekt auf zwei verschiedenen Regulationsebenen abspielt, sollte mit Hilfe einer Insertionsmutagenese Komponenten gefunden werden, welche die Repression des Maltosesystems vermitteln. Dazu wurden wiederum die schon bekannten *lacZ*-Fusionen herangezogen. Änderungen in der Expression solcher Fusionen lassen sich nicht nur im β -Galaktosidase Assay bestimmen, sondern auch auf X-Gal Indikatorplatten.

Als Teststamm wurde HS3084 ausgewählt, da in diesem Stamm der Glycerineffekt am deutlichsten war. Er besitzt eine merodiploide *malk*⁺-*lacZ* Proteinfusion, d.h. das Indikatorgen *lacZ* ist an das letzte Codon von *malk* fusioniert. Dieser Stamm besitzt also ein in seiner Funktion intaktes MalK-LacZ Hybridprotein. In diesen Stamm wurde ein *lamB* Plasmid (pGLamB) transformiert, um eine ausreichende Infektion mit λ -Phagen zu garantieren.

Der Teststamm HS3084/pGLamB wurde für diesen Versuch mit dem Mini-Tn10::Cam tragenden, nicht replikations- und integrationsfähigen λ -Phagen λ NK1324 (Kleckner et al., 1991) infiziert. Die Selektion fand auf die Transposition des durch IS-Elemente flankierten Chloramphenikol-Resistenzgens bei 37°C statt. Dazu wurden TB Cam/ X-Gal Platten mit 0,4% Glycerin verwendet. Es wurde nach solchen Klonen gesucht, dessen *malk*⁺-*lacZ* Fusion durch Glycerin unbeeinflusst bleibt, d.h. die eine blauere Färbung auf X-Gal Platten zeigen als der Ausgangsstamm. Von 22.000 erhaltenen Klonen, die nun das Mini-Tn10::Cam in ihrem Genom trugen, wurden 74 gereinigt und auf ihren Phänotyp hin getestet. Aus den nun verbleibenden 65 Kandidaten konnten drei Gruppen gebildet werden, von denen sich eine Gruppe mit 40 Klonen als falsch erwies. Bei diesen Stämmen war nicht der Glycerineffekt aufgehoben, sondern die Grundaktivität der *lacZ* Fusion war dreifach erhöht. Somit zeigten diese Zellen im reprimierten Zustand die gleiche Expression wie der Wildtyp ohne Glycerin. Es sind zwei Mutationen bekannt, die diesen Phänotyp bewirken könnten. Bei der einen Mutation handelt es sich um eine Insertion im intergenen Bereich zwischen *malt* und *malP* (Kolbus, Diplomarbeit, 1996), die andere liegt in dem Gen *mle* (Decker et al., 1997). Zur Lokalisation der Insertion wurden die Klone mit einem auf KM21 (*malt*::Tn10), POP4063 (*malP*::Tn10), GD1 (*glpR*::Tn10) bzw. KD412 (*mle*::Kan) gezogenen P1-Lysaten transduziert und auf den Verlust der Chloramphenikol-Cassette getestet. Anhand der Cotransduktionsfrequenz konnten zwei Insertionsstellen bestimmt

werden, die zum einen, wie schon beschrieben, zwischen *malT* und *malP* liegt, zum anderen zwischen *glpD* und *malT*. Ein Vertreter der ersten Gruppe ist der Stamm ET123, zu der zweiten gehört ET121. Bei ihnen wurde überprüft, ob eine Sekundärmutation oder wirklich die Tn10::Cam Insertion den Phänotyp hervorruft. Zu diesem Zweck wurden auf den Stämmen ein P1-Lysat gezogen und in den Teststamm HS3084 retransduziert. Die Transduktanten zeigten den gleichen Phänotyp, so dass eine Sekundärmutation ausgeschlossen werden konnte. Da diese Mutanten aber für die hier zu beantwortende Fragestellung nicht von Bedeutung waren, wurden sie nicht weiter untersucht.

Die zweite Gruppe umfasste 14 Klone, die einen Glycerin⁻-Phänotyp zeigten. Da die Zellen unfähig waren auf G3P als alleinige Kohlenstoffquelle zu wachsen, musste davon ausgegangen werden, dass es sich um eine *glpK* Mutation handelt. Dieses Ergebnis wurde durch Cotransduktionstests mit einer *glpF*::Tn10 Mutante (RJ70) verifiziert. Da nur G3P die reprimierende Substanz ist und in einer *glpK* Mutante dies nicht gebildet werden kann, wurden solche Mutationen erwartet. Trotzdem wurde eine Mutante (ET122) aus dieser Gruppe ausgesucht und Sekundärmutationen ausgeschlossen.

Bei den restlichen 11 Klonen war die Repression durch Glycerin nicht ganz aufgehoben, aber mit Repressionsfaktoren von 1,3 bis 2 deutlich geringer als im Wildtyp. Ihnen wurde erst später, als die posttranskriptionale Regulation bekannt war, eine Bedeutung beigemessen. Sie werden daher in den folgenden Kapiteln behandelt.

3.3.2.2 Versuch zur Aufklärung der posttranskriptionalen Regulation

Ziel dieses Versuches war es Komponenten zu finden, die bei der Repression durch Glycerin in der posttranskriptionalen Ebene wichtig sind. Als Maß der Expression des Maltosesystems wurde wiederum eine *lacZ* Fusion (HS3084) verwendet. Durch Kenntnis der Komponenten, die bei der transkriptionalen Repression durch Glycerin beteiligt sind, konnte diese Ebene leicht ausgeschaltet werden. Hierfür wurde die Δ *cya crp** Mutante herangezogen, die nur noch den zu untersuchenden posttranskriptionalen Effekt aufweist. Der verwendete Stamm ET23/ pGLamB sollte, wie im vorhergehenden Versuch, nach der Insertionsmutagenese mit dem Mini-Tn10::Cam tragenden λ -Phagen (λ NK1324) auf TB Cam/ X-Gal/ Glycerin Platten getestet werden. Der Teststamm ET23/ pGLamB wurde mit den λ -Phagen λ NK1324 infiziert und auf die Integration des Transposons in das bakterielle Genom bei 37°C selektioniert. Unter den 50.000 erhaltenen Kolonien wurden 41 Klone gefunden, die den geforderten Phänotyp zeigten. Sie waren auf den verwendeten TB Glycerin/ X-Gal Platten deutlich blauer als der Ausgangsstamm. Diese Mutanten wurden, wie schon beschrieben, durch Retransduktion

in den Ausgangsstamm ET23 auf Sekundärmutationen getestet. Über β -Galaktosidase Tests konnte bei vier Klonen der Phänotyp erneut nachgewiesen werden.

Außerdem zeigte sich, dass drei der 11 in Kapitel 3.3.2.1 beschriebenen Mutationen in einem $\Delta cya crp^*$ Hintergrund durch Glycerin ebenfalls nicht mehr reprimierbar waren. Diese sieben Mutanten wurden im Folgenden weiter untersucht.

3.3.2.3 Charakterisierung der Klone

In Tabelle 11 sind die spezifischen β -Galaktosidase Aktivitäten aller sieben Mutanten zusammengefasst. Wie man unschwer erkennen kann, wurde die *malK⁺-lacZ* Fusion dieser Stämme nicht mehr durch Glycerin reprimiert. Die drei Klone der ersten Mutagenese (ET213, ET214, ET215) zeigten im Wildtyp Hintergrund eine geringe Repression, die allerdings unter einem Faktor von zwei lag. Diese Repression war aber cAMP-abhängig und somit transkriptionaler Natur, da sie im $\Delta cya crp^*$ Hintergrund (ET216, ET217, ET218) verschwand.

Tabelle 11: Spezifische β -Galaktosidase Aktivität der Insertionsmutanten in An- und Abwesenheit von Glycerin

Stämme	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
	TB	TB Glyc
ET211 ²	0,15	0,15
ET212 ²⁾	0,26	0,31
ET130 ²⁾	0,19	0,19
ET131 ²⁾	0,19	0,23
ET215 ¹⁾	0,20	0,13
ET218 ²⁾	0,10	0,08
ET214 ¹⁾	0,21	0,15
ET217 ²⁾	0,12	0,09
ET213 ¹⁾	0,23	0,12
ET216 ²⁾	0,11	0,09

¹⁾ HS3084 Derivat

²⁾ ET23 (HS3084 $\Delta cya crp^*$) Derivat

Die Zellen wuchsen über Nacht in TB oder TB mit 0,4% Glycerin bei 37°C. Die Einheit der spezifischen β -Galaktosidase Aktivität ist $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$.

Aufgrund von Wachstumstests, auf den in Tabelle 12 aufgeführten Kohlenstoffquellen, konnten die Klone in zwei Hauptgruppen aufgeteilt werden:

a) Die erste Gruppe zeichnete sich durch eine Auxotrophie aus. Weder auf den MMA Glucose-, noch auf Glycerin- oder G3P-Platten war ein gutes Wachstum festzustellen (Tab. 12). Außerdem bildete sich auf LB oder TB Platten, auf denen die Klone wuchsen, ein bräunlich-gelber Hof. Diese Absonderung war auch in Flüssigkulturen zu sehen.

b) Die restlichen Mutanten konnten mehr oder weniger alle getesteten Kohlenstoffquellen verwerten und zeigten auch keinen weiteren Phänotyp.

Tabelle 12: Charakterisierung der Insertionsmutanten

Stämme	Glc ¹⁾	Glyc ¹⁾	Xyl ¹⁾	G3P ¹⁾	Besondere Kennzeichen
a)					
ET211	-	-	-	-	braune Absonderung ²⁾
ET212	-	-	-	-	braune Absonderung ²⁾
ET130	-/-	-/-	-/-	-/-	braune Absonderung ²⁾
ET131	-	-	-	-	braune Absonderung ²⁾
b)					
ET213	+/-	+	+	+	
ET214	+/-	+	+	+	
ET215	+	+	+/-	+	

¹⁾ Das Wachstum auf MMA Platten mit den angegebenen Kohlenstoffquellen wurde nach zwei Tagen bei 37°C kontrolliert. Die Symbole bedeuten: -/- kein Wachstum; - sehr schlechtes Wachstum; +/- Wachstum, wobei die Kolonien kleiner waren als der Wildtyp; + normales Wachstum wie der Wildtyp.

²⁾ Auf LB Platten bildete sich ein brauner Hof um die Kolonien bei Wachstum über Nacht bei 37°C.

3.3.2.4 Klonierung und Sequenzierung der Mini-Tn10::Cam Insertionen

Zur Bestimmung der betroffenen Gene wurde jeweils die Mini-Tn10::Cam Insertion zusammen mit einem Stück der angrenzenden chromosomalen DNA kloniert. Dazu wurde die chromosomale DNA der Mutanten mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Nhe*I verdaut und in den ebenso geöffneten Vektor pBR322 kloniert. Die Selektion der Transformation erfolgte auf Chloramphenikol-Resistenz. Die Plasmide wurden daraufhin unter Verwendung der zur Mini-Tn10::Cam Cassette komplementären Cam5' und Cam3' Primer durch die Firma MWG sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen der Stämme ET130 und ET131 konnten mit Hilfe des Programms BlastN der NCIB Datenbank identifiziert werden. Die Insertion in der ersten Mutante liegt in *purK*, dem Gen für eine 5'-Phosphoribosyl-5-carboxyaminoimidazol (NCAIR)-Synthetase der *de novo* Purinbiosynthese, bei 11,9 min. Das zweite Transposon wurde im Promotorbereich von *purR*, dem Repressor des Purinsystems, bei 37,5 min des *E. coli* Chromosoms lokalisiert.

Da es bei den übrigen Stämmen Probleme bei der Klonierung, sowie der Sequenzierung gab, wurde hier eine inverse PCR mit der chromosomalen DNA durchgeführt. Die PCR Produkte wurden, wie im Material und Methoden Teil (2.5.4) erläutert, behandelt. Das Oligonukleotid ah1 wurde zur Bestimmung der unbekanntenen Sequenz durch die Firma MWG verwendet. Die nachfolgende Datenbankrecherche wiederum mit Hilfe des Programms BlastN ergab die Identifikation des Klons ET212. Bei diesem auxotrophen Stamm handelt es sich um eine *purT* Mutante. Das Gen liegt bei 4,7 min und codiert für eine GAR (5'-Phosphoribosylglycinamid)-Transformylase T des *de novo* Purinbiosynthesewegs.

Für ET211 und ET213 konnten trotz mehrmaliger Versuche keine gute Sequenzreaktion erzielt werden. Sie wurden daher nicht weiter charakterisiert.

Die Analyse der Sequenz von ET215 ergab eine Lokalisation im letzten Gen des *glpFKX* Operons bei 88,6 min (Truniger et al., 1992). GlpX ist eine Fructose-1,6-Bisphosphatase II (Donahue et al., 2000).

Eine weitere Insertion (ET214) konnte im ersten Gen des *narUZYWW* Operon identifiziert werden. Die Gene codieren bei 33,4 min auf dem *E. coli* Genom. Bei den Produkten handelt es sich um einen Nitrat/Nitrit Antiporter und die Nitratreduktase Z, die bei der Nitratregulation beteiligt sind (Bonney & Demoss, 1994).

3.3.3 Weitere Charakterisierung der *purK* Mutante

3.3.3.1. Untersuchungen zum Phänotyp der *purK* Mutante

Um die Rolle des Purinbiosynthesewegs beim posttranskriptionalen Glycerineffekt untersuchen zu können, wurde die *purK* Mutante ausgewählt und weiter charakterisiert. Sie zeigt, wie die anderen Klone auch, keine Glycerin-abhängige Repression mehr.

Das Gen *purK* liegt zusammen mit *purE* in einem Operon bei 11,9 min auf dem *E. coli* Chromosom. Es kodiert für die NCAIR-Synthetase der *de novo* Purinbiosynthese. Dieses Enzym katalysiert gemeinsam mit der NCAIR-Mutase (PurE) die Carboxylierung von 5'-Phosphoribosyl-5-aminoimidazol (AIR) (Tiedeman et al., 1989; Watanabe et al., 1989). Ist *purK* ausgeschaltet, kommt es zu einer Akkumulation dieser aromatischen Substanz. Dies macht sich durch eine gelb-bräunliche Absonderung in Flüssig- und Plattenansätzen bemerkbar. Außer der Farbe unterscheiden sich die Klone von ihrem Ausgangsstamm in der Wachstumsgeschwindigkeit und im pH-Wert des Mediums nach Wachstum über Nacht in TB mit Glycerin. Während im Ausgangsstamm das Medium bei Wachstum in Anwesenheit von Glycerin langsam ansäuert, wird dies in der *purK* Mutante verhindert. Hier bleibt der pH-Wert konstant neutral. Diese Effekte werden aber im Folgenden noch näher untersucht.

Wachstumstests zeigten, dass der Stamm zwar in TB wächst, jedoch nicht in Minimalmedium (MMA) (Tab. 12). Nur durch Zugabe eines Purinbausteins, der nach der Blockade gebildet wird, konnte dieser Wachstumsdefekt aufgehoben werden.

3.3.3.2 Die PurK Überproduktion oder Puringabe können den *purK* Effekt aufheben

Wie gerade erwähnt, wurde durch die Zugabe von Purin der Wachstumsdefekt dieses Stammes auf Minimalmedium aufgehoben. In Vollmedium wie TB können Purinmutanten zwar wachsen, aber es sind vielleicht nicht genügend Purinbausteine vorhanden. Um zu untersuchen, ob der Phänotyp durch einen Purinmangel bedingt ist, wurde untersucht, ob durch Zugabe des Purin Nukleosids Guanosin wieder ein Glycerineffekt hervorgerufen werden kann. Tabelle 13 zeigt die β -Galaktosidase Aktivität der *malK⁺-lacZ* Fusion in der *purK* Mutante in TB und TB mit Glycerin bei steigenden Guanosinkonzentrationen.

Während die Guanosingabe in TB gewachsenen Zellen eher einen leichten positiven Einfluss auf die *malK⁺-lacZ* Expression hatte, beobachtet man in Anwesenheit von Glycerin einen konzentrationsabhängigen, negativen Effekt. Mit steigendem Guanosingehalt im Medium stieg die Repression von nahezu Null auf den Wert des

Ausgangsstammes ET23 an. Dieses Ergebnis zeigt, dass Guanosin den *purK* Phänotyp aufheben kann.

Tabelle 13 : Einfluss von Guanosin auf den Phänotyp einer *purK* Mutante

Stamm	Relevanter Genotyp	Guanosin [mM]	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
			TB	TB Glyc
ET23	Δ <i>cya crp</i> *	-	0,21	0,02
ET130	Δ <i>cya crp</i> * <i>purK</i>	-	0,22	0,17
		0,1	0,30	0,11
		0,5	0,26	0,04
		1	0,28	0,02

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens drei unabhängigen Übernachtskulturen. Die Einheit der spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$. Den Wachstumsmedien TB und TB mit 0,4% Glycerin wurden die angegebenen Konzentrationen an Guanosin zugegeben. Die Zellen wuchsen bei 37°C.

Dies müsste auch durch Komplementation der *purK* Defizienz mit einem Plasmid-codierten *purK* der Fall sein. Für diesen Zweck wurde *purK*, wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben, in den Vektor pTrc99A kloniert. Das resultierende Plasmid pPurK trägt nun das Gen unter Kontrolle des IPTG induzierbaren *tac*-Promotors. Die Überexpression von PurK führte, wie in Tabelle 14 gezeigt, zur Aufhebung des durch die *purK* Mutation hervorgerufenen Phänotyps.

Tabelle 14 : Komplementation der *purK* Mutation durch PurK Überproduktion

Stamm	Relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
		TB	TB Glyc
ET130/pTrc99A	<i>purK</i>	0,19	0,21
ET130/ pPurK	<i>purK</i> ⁺	0,21	0,09

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Übernachtskulturen. Die Einheit der spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$. Die Stämme wuchsen bei 37°C in TB und TB mit 0,4% Glycerin. Die Induktion erfolgte mit 100 μM IPTG.

3.3.3.3 Die *purK* Mutation verursacht einen stabilen pH-Wert des Mediums

In dem in Kapitel 3.3.3.2 beschriebenen Experiment wurde gezeigt, dass durch Puringabe der Glycerin-unabhängige Phänotyp der *purK* Mutante ET130 aufgehoben werden kann. Als Wachstumsmedium wurde das Vollmedium TB verwendet. Dieses Medium ist nicht, wie z.B. MMA, gepuffert, sondern ist den pH-Schwankungen während des Wachstums von Zellen unterworfen. Puffert man TB durch Zugabe von MMA und wiederholt das Experiment, so kann man eine erstaunliche Beobachtung machen. Die β -Galaktosidase Aktivitäten in Tabelle 15 zeigen, dass in gepuffertem Medium auch mit 1mM Guanosin durch Glycerin der Wert nicht absank. Er blieb konstant, während dies in den TB-Versuchen in Tabelle 13 nicht der Fall war. Hier wurde in TB/ Glycerin gewachsene Zellen in Anwesenheit von 1mM Guanosin um einen Faktor von 14 reprimiert. Diese Ergebnisse deuten auf eine pH-Abhängigkeit des posttranskriptionalen Glycerineffekt hin.

Tabelle 15 : Die Auswirkungen von Guanosin auf die *purK* Mutanten ET130 in gepuffertem Medium

Stamm	Relevanter Genotyp	Guanosin [mM]	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
			MMATB	MMATB Glyc
ET130	Δ <i>cya crp*</i> <i>purK</i>	-	0,12	0,09
		1	0,12	0,12

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Übernachtkulturen. Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$ angegeben. Die Stämme wuchsen in MMA gepuffertem TB. Die Konzentration der Medienzusätze war 0,4% für Glycerin und 1mM Guanosin. Die Wachstumstemperatur betrug 37°C.

Aufgrund dieser Beobachtung wurde der pH-Wert des Mediums vor und nach Wachstum des Stammes ET130 über Nacht bei 37°C gemessen. Als Anfangswert wurde ein pH von 7 bestimmt. Bei steigenden Guanosinkonzentrationen blieb er in der TB-Übernachtkultur konstant bei 8,5 (Tab.16). Das Medium wurde also während des Wachstums etwas alkalisch. Ist hingegen Glycerin im TB konnte man eine drastische pH-Abnahme auf 4,5 mit Guanosin beobachten. Ohne Guanosin ist in diesem Ansatz nahezu keine Änderung festzustellen. Wie erwartet blieben die Werte in den Ansätzen mit gepuffertem TB unverändert auf pH7 bis 6.

Tabelle 16 : Auswirkungen von Guanosenin auf den pH im Medium verschiedener Übernachtskulturen

Stämme	Relevanter Genotyp	Medien (pH 7)	pH-Wert bei			
			0mM	0,1mM	0,5mM	1mM
			Guanosin			
ET23	$\Delta cya crp^*$	TB	8,5	n.b.	n.b.	n.b.
		TB Glyc	4,5	n.b.	n.b.	n.b.
ET130	$\Delta cya crp^*$ <i>purK</i>	TB	8,5	8,5	8,5	8,5
		TB Glyc	6,5	4,5	4,5	4,5
		MMATB	7	7	7	7
		MMATB Glyc	6	7	7	7

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Übernachtskulturen. Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$ angegeben. Die Stämme wuchsen in MMA gepuffertem TB. Die Konzentration der Medienzusätze war 0,4% für Glycerin und 1mM Guanosenin. Die Wachstumstemperatur betrug 37°C. n.b.: nicht bestimmt.

3.3.3.4 Sind Alarmone der Grund der Repression?

Alarmone sind kleine Moleküle, die als Botenstoffe u.a. in Bakterienzellen fungieren. Wie in Kapitel 1.8 beschrieben, scheinen die Nukleotide Guanosenin 5'-Diphosphat 3'-Diphosphat (ppGpp) und Di(5'-Adenosyl)-Tetraphosphat (AppppA) u. a. auch eine Rolle bei der Regulation von cAMP/CRP abhängigen Genen zu spielen. Sie bestehen beide aus Purinbestandteilen, die in einer *purK* Mutante rar werden. Somit könnte es zu einem Mangel an diesen Botenstoffen kommen. Die Beteiligung von ppGpp konnte aufgrund einer *relA* Mutation der verwendeten Stämme, die dadurch dieses Alarmon nicht synthetisieren können, von vorne herein ausgeschlossen werden. Um die Rolle von AppppA zu untersuchen wurde ein Plasmid (pAP47), welches das Gen *apaH* trägt, in dem Teststamm ET23 (HS3084 $\Delta cya crp^*$) transformiert. Dieses Gen kodiert für die 16S ribosomale RNA Methyltransferase, die für den Abbau des adenylierten Polyphosphats zuständig ist (van Gemen et al., 1987). Mutationen in *apaH* führen zu einem 16 Mal höheren AppppA-Spiegel als im Wildtyp. Die Folge ist eine Repression cAMP/CRP regulierter Operone, ähnlich der des Glycerineffekts (Farr et al., 1989). Bei Überproduktion dieses Enzyms müsste der Alarmon Spiegel absinken, wie man es auch bei einem Purinmangel vermuten würde. Dieser Zustand müsste sich demnach

phänotypisch gleich auswirken, und Glycerin dürfte keine Einfluss auf die *malK⁺-lacZ* Expression haben. Wie man aber in Tabelle 17 erkennen kann, sank die β -Galaktosidase Aktivitäten in beiden Stämmen im Glycerin Ansatz um den Faktor 2. Die Beteiligung von AppppA an der Glycerin-abhängigen Katabolitrepression ist demzufolge unwahrscheinlich.

Tabelle 17 : Untersuchung zur Rolle von AppppA

Stämme	Relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
		TB	TB Glyc
ET23/ pBR322		0,10	0,05
ET23/ pAP47	<i>apaH⁺</i>	0,11	0,05

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Übernachtkulturen. Die Einheit der spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$. Die Stämme wuchsen bei 37°C in TB und TB mit 0,4% Glycerin. Das *apaH* Gen ist unter der Kontrolle des wt Promotors.

3.3.3.5 Ist das verlangsamte Wachstum die Ursache des Phänomens?

Da keine spezifische Rolle der Purinbiosynthese am Glycerineffekt gefunden werden konnte, sollte in diesem Experiment überprüft werden, ob ein allgemeiner Effekt der *purK* Mutation für den Phänotyp indirekt verantwortlich ist. Eine Möglichkeit ist die Wachstumsgeschwindigkeit der Mutante mit der des Ausgangsstamms zu vergleichen.

Der Stamm ET130 zeigte eindeutig Wachstumsdefekte, denn die Kultur ging schon nach ca. 4 Stunden bei einer optischen Dichte von ungefähr 1,2 in die stationäre Phase über. Die Generationszeit lag bei 55 min in TB gleichermassen wie in TB/ Glycerin. Glycerin steigerte demnach in dieser Mutante nicht das Wachstum, wie es im Ausgangsstamm der Fall war. ET23 verdoppelte sich in ca. 50 min einmal, während Glycerin die Zeit auf 35 min verkürzte. Die optische Dichte dieser ausgewachsenen Kulturen zeigte Unterschiede. Der Ausgangsstamm wuchs in TB auf $OD_{578}=2,5$, mit Glycerin jedoch auf 3. Die Bestimmung des pHs entlang der Wachstumskurve ergab eine Erniedrigung in der mittleren bis späten logarithmischen Phase in Anwesenheit von Glycerin. In der ET130 Kultur blieb der pH unter diesen Bedingungen wie erwartet konstant.

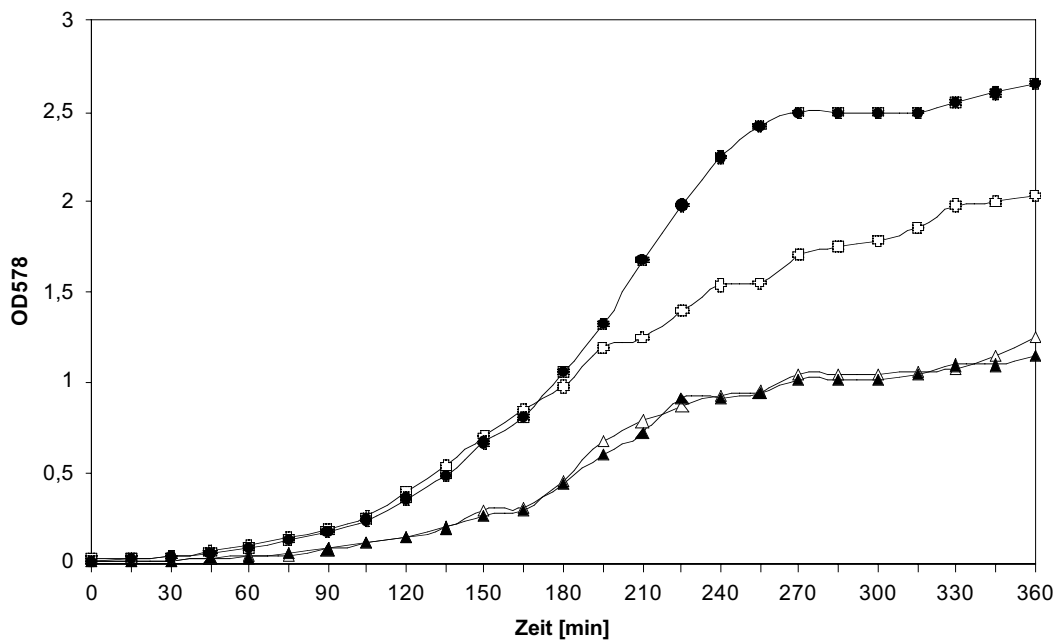


Abbildung 9: Auswirkungen einer *purK* Mutation auf die Wachstumskurve

Wachstumskurve der Stämme ET23 (Kreis) und ET130 (Dreieck) in TB bzw. TB mit 0,4% Glycerin (ausgefüllte Zeichen).

3.3.4 Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der posttranskriptionalen Repression

Aus bisher ungeklärten Ursachen sinkt der pH des Mediums einer Übernachtskultur, die in TB mit Glycerin gewachsen ist, stark ab. Wie gezeigt werden konnte (siehe Tab. 16 ; Kapitel 3.3.3.3) kann ein Purinmangel, neben der Repression durch Glycerin, auch dieses Phänomen aufheben. Es muss ein Zusammenhang zwischen pH-Wert und Repression bestehen. Gab man z.B. das Purin Nucleosid Guanosin in TB, so sank der pH wieder in Anwesenheit von Glycerin und die *malK* Expression wurde reprimiert. Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob diese pH-Abhängigkeit nur für die *purK* Mutante Gültigkeit hat.

Tabelle 18: Spezifische β -Galaktosidase Aktivität transkriptionaler bzw. translationaler *malT-lacZ* Fusionen in verschiedenen Medien

Stämme	Fusion	Relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
			MMA+ 1%caa	+ Glyc
Bre1161	<i>malT-lacZ</i> ¹⁾		0.53	0.17
ET24	<i>malT-lacZ</i> ¹⁾	Δ <i>cyo crp</i> *	0.27	0.30
POP3506	<i>malT-lacZ</i> ²⁾		0,14	0,06
ET25	<i>malT-lacZ</i> ²⁾	Δ <i>cyo crp</i> *	0.16	0.14

Die spezifische Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$ angegeben. Die Kulturen wuchsen in MMA mit 1% caa bei 37°C über Nacht. Die Konzentration der restlichen Medienzusätze betrug 0,4%.

1) transkriptionale Fusion

2) translationale Fusion

Wuchsen die Teststämme Bre1161 und POP3506 in gepuffertem Minimalmedium (MMA) mit Aminosäuren als Kohlenstoffquelle, sank die Expression der transkriptionalen, sowie der translationalen *malT-lacZ* Fusion in dem Glycerin-Ansatz ab (Tab. 18). Es fällt jedoch auf, dass die Repression in POP3506 (Faktor 2) nicht so stark war wie in ungepuffertem Medium (Faktor 5). Wie erwartet hatte Glycerin in einem Δ *cyo crp** Hintergrund auf transkriptionaler Ebene keinen Einfluss mehr, wie die Werte des Stamms ET24 zeigen. Doch auch die Mutante ET25, die in TB eine posttranskriptionale Repression zeigt, wurde nahezu nicht mehr reprimiert. Der pH blieb in allen MMA Kulturen konstant. Dieser Effekt ist also, wie vermutet, pH-abhängig.

Im Folgenden stellt sich die Frage, ob der pH des Wachstumsmediums der eigentliche Auslöser des posttranskriptionalen Effekts ist. Es wurde tatsächlich schon beobachtet, dass saurer externer pH die *mal*-Genexpression reduzieren kann (Heyde et al., 1991; Alonzo et al., 1998). Um dies nachzuprüfen, ließ man die Stämme POP3506 und ET25 in speziell gepufferten Minimalmedium bei pH7 und pH5 wachsen. Die Kontrolle des pHs zeigte trotz Pufferung eine leichte Alkalisierung. Wie in Tabelle 19 ersichtlich, konnte aber allein durch eine pH-Drift die *malT* Expression weder im Wildtyp noch in der Δ *cyo crp** Mutante reprimiert werden. Daraus wird ersichtlich, dass der posttranskriptionale Regulationsmechanismus pH-abhängig ist, aber dennoch Glycerin vorhanden sein muss. Der pH-Wert allein kann also nicht der Auslöser sein.

Tabelle 19 : Einfluss des externen pH-Werts auf translationale *malT-lacZ* Fusionen

Stamm	Relevanter Genotyp	Spezifische Aktivität	β -Galaktosidase
		pH7 (7,8)	pH5 (6)
POP3506		0,15	0,12
ET25	Δ <i>cya crp</i> *	0,07	0,10

Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min} \cdot \text{mg Protein}$ angegeben. Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Übernachtskulturen. Die Stämme wuchsen in einem speziell gepuffertem Minimalmedium (50mM MES, 50mM TAPS, 40mM KCl, 21mM NH_4Cl , 100 μM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 0,7 μM FeCl_3 , 25 μM Na_2SO_4 , 1mM KH_2PO_4 und 50mM NaCl). Die entsprechenden pH Werte wurden mit 1N NaOH oder 1N HCl eingestellt. Die Werte, die in Klammern angegeben sind, entsprechen dem pH der Übernachtskultur. Als Kohlenstoffquelle diente 1% caa.

3.4 Der Einfluss von Glycerin auf das Muster der synthetisierten Proteine der Zelle

Wie man schon aus vorangegangenen Untersuchungen weiß, ist die Katabolitrepression durch Nicht-PTS Kohlenstoffe nicht auf das Maltosesystem beschränkt, sondern es ist ein pleiotropes Phänomen. Durch die Effekte, die diese Zucker auf die Adenylatcyclase haben, muss man annehmen, dass alle cAMP/CRP regulierten Gene davon betroffen sind. Um einen Eindruck über das Ausmaß dieser Repression zu bekommen, wurden Zellen des Wildtypstamms MC4100 in TB und TB mit 0,4% Glycerin gezogen und nach dem im Material und Methoden Teil beschriebenen Protokoll behandelt (Kapitel 2.6.6). Die erhaltenen Zellextrakte wurden im Labor von Dr. U. Völker aus Marburg durch eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, geblottet und durch Tintenfärbung sichtbar gemacht. In Abbildung 10 sind die Membranen zu sehen. Mittels Pfeile sind viele Proteine gekennzeichnet, deren Menge durch Glycerin sowohl gesteigert, als auch reduziert wurden.

Die zehn prominentesten Proteine, deren Menge in Anwesenheit von Glycerin abnahm, wurden über MALDI-Analysen identifiziert und sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Auffällig ist bei diesen Proteinen, dass man sie in zwei Hauptgruppen aufteilen kann. In der ersten Klasse findet man eine Anzahl von periplasmatischen Bindeproteinen, die der ABC Transporter für Glutamin (*gln*), Galaktose (*mgl*), Oligopeptiden (*opp*) und Maltose (*mal*) angehören. Die zweite Gruppe beinhaltet Enzyme des Tricarbonsäurezykluses. Das DNA-Bindeprotein Dps („DNA Bindingprotein of

Starved Cells“) und eine Aldehyddehydrogenase (*aldA*) sind keiner der Gruppen zuzuordnen.

Zur besseren Auftrennung wurden für das Glutamin-Bindeprotein und der Citratsynthase ein Gel im pH-Bereich von 3 bis 10 angefertigt. Die beiden Ausschnitte sind in Abbildung 10A dargestellt. Für die restlichen Proteine fand die Auftrennung zwischen pH 4 bis 7 statt (Abb. 10B).

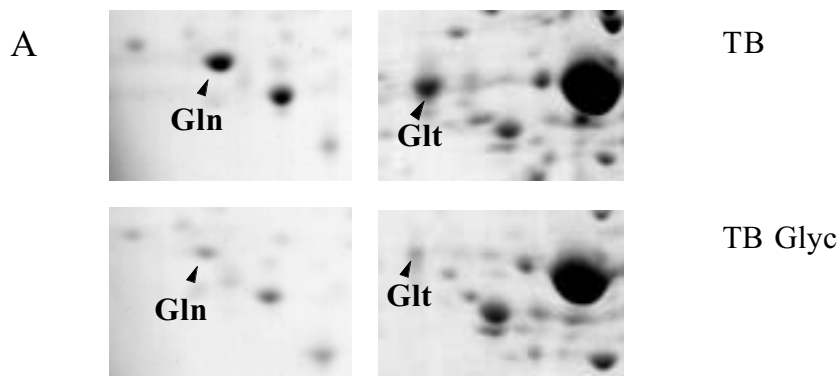


Abbildung 10 : Der Glycerineinfluss auf das Gesamtproteinbild der Zelle

Der Stamm MC4100 wuchs bei 37°C ÜN zum einen in TB zum andern in TB mit 0,4% Glycerin. Der Zellextrakt wurde, wie im Material und Methoden Teil beschrieben, behandelt. Jeweils 300µg Protein wurden durch Dr. Uwe Völker in einer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Proteine, die durch Glycerin in ihrer Menge reduziert werden, sind mit einem schwarzen Dreieck gekennzeichnet, durch Glycerin induzierte mit einem weißen Dreieck.

A: Ausschnitte aus einem 2D-Gel über einen pH von 3 bis 10

B: 2D-Gel über einen pH Bereich von 4 bis 7 (siehe nächste Seite)

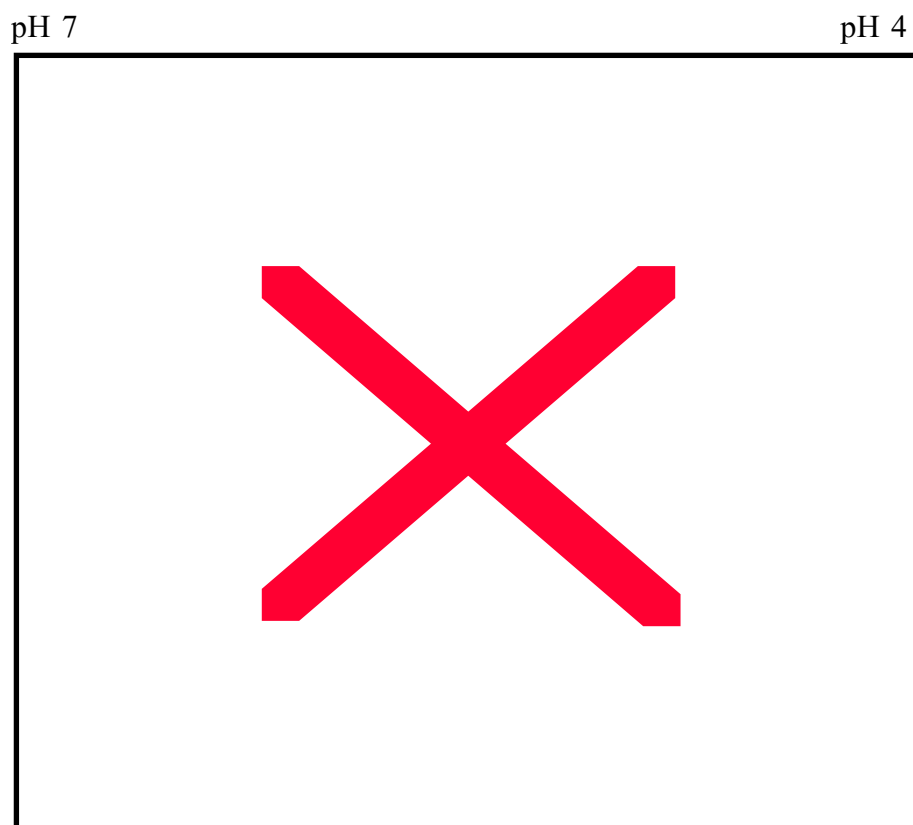
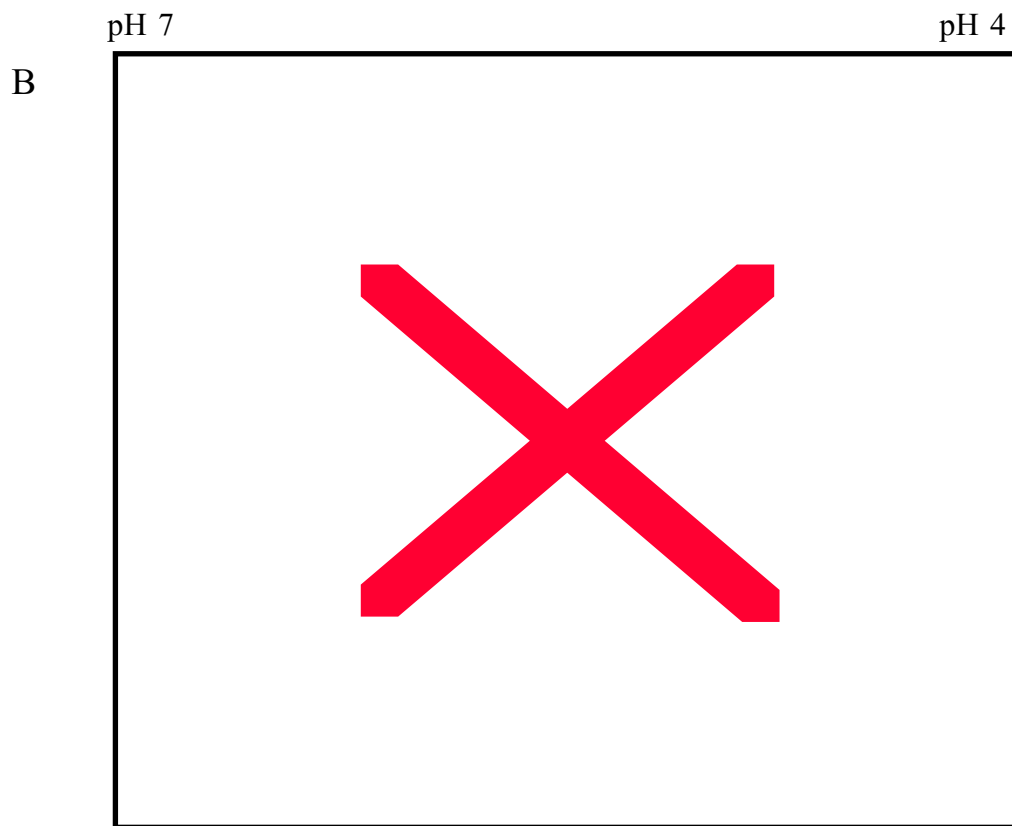


Tabelle 20: Überblick über eine Auswahl an Glycerin-reprimierten Genen

Name	Lokalisation [min]	Funktion
<u>1.) Periplasmatische Bindeproteine:</u>		
<i>glnH</i>	18,3	Glutamin-Bindeprotein
<i>malE</i>	91,5	Maltose-Bindeprotein
<i>mglB</i>	48,3	Galaktose-Bindeprotein
<i>oppA</i>	28,1	Oligopeptid-Transport- und Bindeprotein
<u>2.) Komponenten des Tricarbonsäurezykluses:</u>		
<i>acnB</i>	2,8	Aconitase B
<i>gltA</i>	16,3	Citratsynthase
<i>icd</i>	25,8	NADP ⁺ spez. Isocitratdehydrogenase
<i>mdh</i>	72,9	Malatdehydrogenase
<i>sucC</i>	16,5	Succinyl-CoA Synthetase (β -Untereinheit)
<u>3.) Sonstige:</u>		
<i>aldA</i>	32,2	Aldehyddehydrogenase
<i>dps</i>	18,3	DNA Bindeprotein bei Hungerbedingungen

Die Identifizierung der Proteine aus einem gefärbten 2-D Gel fand durch die Methode des Peptidmassen Fingerprints statt und wurde von Dr. U. Völker durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit in Datenbanken vorhandenen Proteinen mit Hilfe des Programmes MS-Fit verglichen.

3.5 Katabolitrepression durch andere Nicht-PTS Zucker

3.5.1 Untersuchung zur Repression einiger Nicht-PTS Zucker

Wie in Tabelle 21 demonstriert werden kann, werden *mal*-Gene auch durch andere Kohlenstoffquellen, die nicht über das PTS transportiert werden, reprimiert. Zwar ist bei keiner dieser Substanzen die Repression so hoch wie bei dem PTS Zucker Glucose (Faktor 73), doch ist sie überall deutlich. Mit einem Repressionsfaktor von 11 ist der Effekt von Xylose in der Gruppe der Nicht-PTS Zucker am stärksten, für Arabinose ist er mit Faktor 1,7 am schwächsten. Was auffällt, ist die geringe Induktion der *malK⁺-lacZ* Fusion in TB durch Maltose.

Tabelle 21: Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen auf eine translationale *malK⁺-lacZ* Fusion

Stämme	Fusion	Mediumszusatz	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität
HS3084	<i>malK⁺-lacZ</i>	-	0,22
		Mal	0,57
		Glc	0,003
		Glyc	0,05
		G3P	0,07
		Glc6P	0,07
		Gal	0,07
		Gluc	0,11
		Xyl	0,02
		Ara	0,13
Rham	0,04		

Die spezifische Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$ angegeben. Sie wurde in Doppelbestimmungen aus drei unabhängigen TB-Übernachtskulturen ermittelt. Die Konzentration der Zuckerzusätze betrug 0,4%, bei Glc 0,2%. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: Ara: Arabinose; Gal: Galaktose; Gluc: Gluconat; Glc: Glucose; Glc6P: Glucose-6-Phosphat; Glyc: Glycerin; G3P: Glycerin-3-Phosphat; Mal: Maltose; Rham: Rhamnose; Xyl: Xylose.

Bei diesen Substanzen stellt sich nun die Frage, ob sie verstoffwechselt werden müssen um reprimieren zu können oder ob eine Phosphorylierung der Kohlenstoffe reicht. Daher wurden einige dieser Beispiele aus Tabelle 21 näher untersucht.

3.5.2. Isolierung und Charakterisierung einer Insertionsmutante, die durch Xylose nicht mehr reprimierbar ist

Parallel zu den in 3.3.2 erwähnten Experimenten wurde der gleiche Versuchsansatz auch für Xylose angewendet. Der Teststamm HS3084/pGLamB wurde wiederum mit dem Mini Tn10::Cam tragenden λ -Phagen (λ NK1324) infiziert und auf TB Cam/ X-Gal Platten, dieses Mal mit Zusatz von 0,4% Xylose, ausplattiert. Aus 50.000 Klonen der Insertionsmutagenese konnten 19 gefunden werden, die auf den Indikatorplatten blauer als ihr Ursprungstamm waren. Doch nach dem Retransduktionstest war nur noch eine Mutante übrig, deren Phänotyp an die Mini-Tn10::Cam Insertion gebunden war.

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Wachstum auf verschiedenen Zuckern getestet, und ermittelt, dass die Mutante unfähig ist auf Xylose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Die Vermutung lag daher nahe, dass es sich bei dem Klon um eine Xylosestoffwechselmutante handelt. Wenn man von der Annahme ausgeht, dass auch im Fall der Xylose die phosphorylierte Form die Repression auslöst, so dürfte die Blockade des Metabolismus nicht nach der Phosphorylierungsreaktion sein. Die Mutation müsste demnach in den Genen für die Xylose-Isomerase (*xylA*) oder für die Kinase (*xylB*) liegen. Um den Insertionspunkt und damit das betroffene Gen zu lokalisieren wurde die Tn10 Insertion mit angrenzender chromosomaler DNA, wie schon in Kapitel 3.3.2.4 angegeben, kloniert und sequenziert. Mit Hilfe der in der NCIB Datenbank gespeicherten Sequenzdaten konnte das Programm BlastN die Sequenz, wie vorausgesagt, dem Gen *xylB* zuordnen. Der Insertionspunkt konnte zwischen Base 19 und 20 bestimmt werden. Das bei 80,29 min liegende Gen kodiert in *E. coli* für die Xylulosekinase, die Xylulose zu Xylulose-5-Phosphat phosphoryliert. Dieses Zuckerphosphat steht mit Ribulose-5-Phosphat im Gleichgewicht und wird über den Pentosephosphatweg weiter metabolisiert.

Die spezifischen β -Galaktosidase Aktivitäten des Ausgangsstammes und der *xylB* Mutante (ET132) in TB und TB mit Xylose sind in Tabelle 22 zu sehen. Wie die Werte zeigen war die Expression der Fusion des in TB Xylose gewachsene Ausgangsstammes um den Faktor 5,8 reprimiert, während dies für ET132 nicht zutrif. Die Resultate stützen die Hypothese, der phosphorylierten Zucker als repressorische Substanz.

Tabelle 22 : Einfluss der unbekanntes Tn10-Insertion auf die Repression durch Xylose

Stamm	Relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
		TB	TB Xyl
HS3084/pGLamB	<i>malk⁺-lacZ; plamB⁺</i>	0,23	0,04
ET132	<i>malk⁺-lacZ;</i> <i>xylB::Tn10 (Cam^R)</i>	0,22	0,26

Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Übernachtkulturen. Die Einheit der spezifische β -Galaktosidase Aktivität ist $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$. Die Stämme wuchsen bei 37°C in TB und TB mit 0,4% Xylose.

3.5.3. Untersuchung von Galaktosemutanten

Im Zuge weiterer Studien sollten auch noch andere Stoffwechselwege betrachtet werden. Für den Transport von D-Galaktose sind in *E. coli* zwei induzierbare Systeme verantwortlich. Zum einen gibt es die PMF-getriebene Galaktose-Permease GalP und zum anderen das hoch affine *mgl* System. Bei letzterem handelt es sich um einen Bindeprotein-abhängigen ABC Transporter. Im Cytoplasma wird die Galaktose durch die Kinase GalK ATP-abhängig phosphoryliert. Galaktose-1-Phosphat (Gal1P) wird über die Gal1P-Uridyl-Transferase GalT mit Glucose-1-Phosphat (Glc1P) im Gleichgewicht gehalten. Die dafür benötigte UDP-Glucose wird durch die UDP-Glucose Pyrophosphorylase Reaktion bereitgestellt.

Mutanten, die die Transferase GalT nicht mehr besitzen, können auf Galaktose als Kohlenstoffquelle nicht mehr wachsen und akkumulieren Gal1P. Um zu testen, ob dieses Zuckerphosphat, analog zu G3P, die Repression auslöst, wurde eine *galT* Mutante (ET194) konstruiert. Doch die β -Galaktosidase Tests ergaben keine Veränderung der Aktivität bei Anwesenheit von Galaktose in diesem Stamm (Tab. 23). Indes zeigte sich eine Induktion der *malt-lacZ* Expression beim Ausschalten von *galT*. Die Aktivität in TB stieg von einem Grundwert des Wildtyps von 0,58 $\mu\text{mol/min}^* \text{ mg}$ auf 1,28 in der Mutante an.

Das nächste Zuckerphosphat im Abbauweg der Galaktose ist Glc1P. Durch die Blockierung der Phosphoglukomutase (Pgm) Reaktion, die zu Glucose-6-Phosphat (Glc6P) führt, konnte aber wiederum keine Repression durch Galaktose gemessen

werden. Erst in einem *pgi* Stamm (ET187) war dies möglich. Dieser Mutante fehlt die Phosphoglucoisomerase, die Glc6P in Fructose-6-Phosphat umwandelt. Sie können auf Zuckern, wie der Galaktose, langsam wachsen, indem sie den Pentosephosphat-Weg einschlagen (Fraenkel, 1996). Gab man diesen Zellen Galaktose, so sank die Expression um einen Faktor 2,8. Diese Repression ist mit der des Wildtyps (3,2) vergleichbar. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass Glc6P der Auslöser der Galaktoserepression ist. Die Beteiligung von Gal1P und Glc1P an dieser Regulation konnte ausgeschlossen werden.

Tabelle 23: Der Einfluss von Galaktose auf einige Mutanten des Galaktosestoffwechsels

Stämme	Relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
		TB	TB Gal
Bre1161		0,58	0,18
ET194	<i>galT</i>	1,28	1,06
ET182	<i>pgm</i>	0,60	0,63
ET187	<i>pgi</i>	0,55	0,20

Die spezifische Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$ angegeben und entstand aus Doppelbestimmungen aus drei unabhängigen Kulturen. Die Stämme wuchsen in TB bei 37°C über Nacht. Die Galaktose-Konzentration betrug 0,4%.

3.5.4 Untersuchungen zur Repression durch Glucose-6-Phosphat

Glc6P ist ein physiologisch wichtiger Zucker, da viele Abbauwege von Kohlenhydraten hier in die Glykolyse einmünden. Daher ist es nicht verwunderlich, wenn dieses Zuckerphosphat die repressorische Substanz darstellen würde. Um etwas über den Mechanismus dieser Repression zu erfahren, musste der Einfluss von Glc6P auf das Maltosesystem untersucht werden.

Glc6P gehört zu den Nicht-PTS Zuckern und kann über die UhpT Permease ins Cytoplasma transportiert werden. Es reprimiert die *malT* Expression sehr stark (Tab. 24). Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität sank im Versuch um den Faktor 11,6, wenn die Zellen in Gegenwart von Glc6P wuchsen.

In Arbeiten über die „Inducer Exclusion“ durch Nicht-PTS Zucker in *E. coli* beschreiben Hogema et al. eine Dephosphorylierung von $EIIA^{Glc}$ durch Glc6P, die abhängig ist vom weiteren Abbau dieser Komponente (Hogema et al., 1998). Sie zeigten, dass in einer *pgi* Mutante nur eine leichte Dephosphorylierung durch Glc6P stattfindet, wohingegen im Wildtyp fast alles $EIIA^{Glc}$ dephosphoryliert vorliegt.

Um zu testen, ob für die Repression des Maltosesystems dieser Stoffwechselschritt notwendig ist, wurde die Aktivität der *malt-lacZ* Fusion in dieser Mutante im TB und TB/ Glc6P Ansatz bestimmt (Tab.24). Gegensätzlich zu den Ergebnissen Hogemas konnte auch in diesem Stamm ein deutlicher, negativer Einfluss von Glc6P nachgewiesen werden (Faktor 7,6).

Tabelle 24: Einfluss einer *pgi* Mutation auf die Repression durch Glucose-6-Phosphat

Stämme	Relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität	
		TB	TB Glc6P
Bre1161		0,58	0,05
ET187	<i>pgi</i>	0,61	0,08

Die spezifische Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$ angegeben. Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus drei unabhängigen Übernachtskulturen. Die Kulturen wuchsen in TB bei 37°. Die Glc6P-Konzentration betrug 0,2%.

Als nächstes musste überprüft werden, ob $EIIA^{Glc}$ überhaupt der alleinige Vermittler dieses negative Effekts durch Glc6P auf die Genexpression ist oder ob die Möglichkeit eines zweiten Metabolismus-unabhängigen Mechanismus besteht. Desweiteren wurde Gluconat, Xylose und Galaktose untersucht.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 25 zusammengefasst. Während in allen Ansätzen die Aktivität der *malt-lacZ* Fusion im Wildtyp stark nachließ, war dies in der *crr* Mutante (ET126) nicht mehr der Fall. Die Zucker scheinen ausschließlich über den $EIIA^{Glc}$ -abhängigen Mechanismus zu wirken. Glc6P stellt in diesem Versuch jedoch eine Ausnahme dar, da die *crr* Mutante noch geringfügig reprimiert wurde. Die spezifische Aktivität sank von 0,07 auf 0,04 $\mu\text{mol/min}^* \text{ mg}$ ab, so dass hier keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte.

Tabelle 25: Die Rolle von EIIA^{Glc} bei der Glucose-6-Phosphat, Gluconat, Xylose und Galaktose vermittelten Repression

Stämme	Relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität			
		Glc6P	Gluc	Xyl	Gal
Bre1161		0,58	0,05	0,13	0,08
ET126	<i>crr</i>	0,07	0,04	0,06	0,10

Die spezifische Aktivität ist in $\mu\text{mol Substrat/ min}^* \text{ mg Protein}$ angegeben. Jeder Wert entstand aus Doppelbestimmungen aus drei unabhängigen Übernachtskulturen. Die Kulturen wuchsen in TB bei 37°. Die Glc6P-Konzentration betrug 0,2%, bzw. 0,4% bei Gluconat, Xylose und Galaktose.

4. Diskussion

4.1 Der Einfluss von Glycerin auf das Maltosesystem

Die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels in *E. coli* ist ein komplexes Netzwerk. Viele Kohlenstoffquellen sind in der Lage die betreffenden Stoffwechselgene zu induzieren und gleichzeitig andere Systeme zu reprimieren. Das wohl bekannteste Beispiel ist die Katabolitrepression durch Glucose oder auch Glucoseeffekt genannt. Hier ist der PTS-abhängige Transport von Glucose entscheidend für die Repression von katabolit-sensitiven Operonen. Denn die Dephosphorylierung von $EIIA^{Glc}$ -P während des Transports wirkt sich negativ auf die Aktivität der Adenylatcyclase aus und führt somit zu einem Absinken des cAMP-Spiegels.

Während die klassische Katabolitrepression intensiv untersucht und nahezu verstanden ist, wusste man vor kurzem nicht einmal um die Existenz einer anderen Art von Katabolitrepression. Sie wird durch Kohlenstoffquellen ausgelöst, die nicht über das Phosphotransferase System transportiert werden, wie z.B. Glc6P (Hogema et al., 1997), Xylose oder Glycerin (Eppler & Boos, 1999). Über die Wirkungsweise dieses Phänomens war jedoch sehr wenig bekannt.

Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit war die Erarbeitung eines Modells für den Mechanismus der Katabolitrepression durch Nicht-PTS Zucker. Zur Lösung dieser Aufgabenstellung wurde das Maltosesystem herangezogen, um daran den Einfluss von Glycerin zu untersuchen. Dieses metabolische System gehört zu den bestuntersuchten in *E. coli* und ist daher gut als Modellsystem für solche Zwecke geeignet. Glycerin wurde gewählt, da der Abbauweg dieser Kohlenstoffquelle nicht sofort in die Glykolyse einmündet. Stoffwechselmutanten sind daher relativ leicht zu untersuchen, und es wurde schon Vorarbeit geleistet.

Wie vorangegangene Ergebnisse meiner Diplomarbeit (1997) zeigten, bewirkt die Zugabe von Glycerin bzw. G3P zum Wachstumsmedium eine fünffache Verringerung der *malt* Expression. Da MalT die Funktion des positiven Regulators des Maltoseregulon besitzt, ist die Konsequenz eine Abnahme der Transkription aller *mal*-Gene. Aufgrund der Tatsache, dass die *malt* Expression Induktor-unabhängig abläuft und nicht autoreguliert wird, sind „Inducer Exclusion“ Effekte auszuschließen. Man misst also in diesem Fall einzig und allein die Einflüsse auf die Genexpression.

In darauf folgenden Studien konnte durch eine Blockade des Phosphorylierungsschrittes von Glycerin zu G3P gezeigt werden, dass nicht Glycerin sondern G3P der Auslöser der Repression ist. Verhindert man einen weiteren Metabolismus von G3P durch

Ausschalten der Dehydrogenase GlpD, so bleibt der Glycerineffekt, wie die Repression genannte wurde, erhalten. Darüberhinaus ist der Effekt weder durch die Anwesenheit des *glp*-Repressors (GlpR), noch durch erhöhte Mengen an anderen *glp*-Genprodukten bedingt.

Da die verwendete *glpD* Mutante gleichzeitig auch eine *glpR* Mutation trägt, ist das ganze System in diesem Stammhintergrund konstitutiv exprimiert. Hier stellt sich die Frage, ob eine erhöhte Menge an GlpK zusammen mit G3P nicht das Enzym EIIA^{Glc} austitriert und somit indirekt eine Repression verursacht. Die Glycerinkinase GlpK ist das Zielprotein der „Inducer Exclusion“ und ist als Tetramer befähigt vier Moleküle EIIA^{Glc} zu binden (Hurley et al., 1993). Es wurde sogar schon beschrieben, dass unter Bedingungen, in denen das *glp*-System induziert ist, der Transport von PTS Zuckern aufgrund Titrationeffekten inhibiert ist (Rohwer et al., 1998). Womit dieser Einwand durchaus berechtigt wäre, gäbe es da nicht den Befund, dass G3P auch in *glpK* Mutanten reprimiert. Trotz dieser Tatsache wurde dieses Phänomen nochmals näher untersucht, und die Titration von EIIA^{Glc} mit Hilfe zweier weiterer Ergebnisse ausgeschlossen. Zum einen wurde eine *malt-lacZ* Fusion in einer für diesen Zweck konstruierten *glpD*, *glpK* Doppelmutante mit der gleichen Intensität reprimiert wie der Wildtyp (Tab. 8). Und dies obwohl weder ein Abbau von G3P noch eine Titration von EIIA^{Glc} durch GlpK stattfinden konnte. Zum anderen wirkte sich eine EIIA^{Glc} -Überproduktion nicht nennenswert auf den Glycerineffekt aus. Der Repressionsfaktor wurde zwar in allen gemessenen Stämmen (Bre1161, ET18, ET16) geringfügig kleiner, so sank er z.B. in dem konstitutiven *glpD,R* Stamm (ET18) von einem Faktor von 2,6 ohne Plasmid auf einen Wert zwischen 2,2 und 1,9 in Anwesenheit des *crr*-Plasmids (Tab. 9). Jedoch müsste der Effekt ganz aufgehoben sein, wenn das Argument der Titration von EIIA^{Glc} durch GlpK stimmen würde. Diese marginalen Effekte haben aber höchstwahrscheinlich andere Gründe und werden zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert (Kapitel 4.3).

Die Unabhängigkeit vom Metabolismus bei der Repression eines weiteren Nicht-PTS Zuckers, Glc6P, wurde schon von Kanazawa & Anraku (1978) beschrieben. Die Autoren zeigten mit radioaktiv markiertem Glc6P, dass die Repression aufgehoben werden kann, sobald das Hexosephosphat gewaschen oder verbraucht wird. Ebenfalls ist das nicht metabolisierbare 2-Deoxy-Glc6P in der Lage die Transkription der β -Galaktosidase negativ zu beeinflussen. In einer Arbeit zur Untersuchungen des Uhp Transporters postulieren Gstrein-Reider & Schweiger (1982) ein anderes Modell. Die Autoren schliessen, dass die Regulation des cAMP-Spiegels durch Nicht-PTS Zucker nicht die energetische Situation in der Zelle widerspiegelt. Vielmehr, so ihre Hypothese, ist es der Transport von Energielieferanten jeglicher Form, der Einfluss nimmt. Doch es konnte nie eine ausreichende Erklärung für diese Aussage gefunden werden.

Anders scheint es bei der „Inducer Exclusion“ durch Nicht-PTS Zucker, wie z.B. Glc6P zu sein. Es wird angenommen, dass der Abbau von Glc6P wichtig für das Phänomen ist, da hier das PEP/ Pyruvat Verhältnis ausschlaggebend zu sein scheint (Hogema et al., 1997). Im Rahmen ihrer Untersuchungen fanden Hogema et al., dass EIIA^{Glc} auch hier beteiligt ist (Hogema et al., 1998). Jedoch wurde eine Beteiligung dieser PTS Komponente an der Katabolitrepression durch die Autoren ausgeschlossen. Sie fanden, dass sich die Aktivität der β -Galaktosidase sowohl im Wildtyp, als auch in einem EIIA^{Glc}-defizienten Stamm (Δcrr) noch durch Glc6P, Lactose und Gluconat senken ließ. Die Ursache sahen sie in einem EIIA^{Glc}-unabhängigen Absinken der cAMP/CRP-Menge. Doch steht diese Aussage im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erhaltenen Daten. Hier konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Transkription einer *malT-lacZ* Fusion in einer *crr* Mutante (ET126) durch Glycerin unbeeinflusst bleibt (Tab.5).

Hogema untersuchte bei seinen Versuchen die Aktivität der Wildtyp β -Galaktosidase, d.h. es werden Einflüsse auf die Transkription als auch auf die Translation sichtbar. Dies würde im Fall der Reporterfusionen einer translationalen Fusion entsprechen. Betrachtet man sich die Ergebnisse der Aktivitäten dieser Fusion (ET127) in Tabelle 5, so stellt man fest, dass auf posttranskriptionaler Ebene Glycerin auch ohne EIIA^{Glc} reprimieren kann. Die transkriptionale *malT-lacZ* Fusion hingegen wird bei Abwesenheit von EIIA^{Glc} (ET126) durch Glycerin nicht beeinflusst. Folglich müssen zwei verschiedene Regulations-mechanismen existieren, die man nur im Vergleich der beiden unterschiedlichen Fusionstypen sehen kann. Während die posttranskriptionale Repression tatsächlich EIIA^{Glc}-unabhängig ist, braucht der Effekt auf die Transkription diese Komponente.

Bei der Untersuchung der beiden *malK-lacZ* Fusionen fiel auf, dass in Abwesenheit von EIIA^{Glc} neben der translationalen (ET125) auch die transkriptionale Fusion (ET128) durch Glycerin deutlich reprimiert wird. Die Erklärung hierfür liegt wiederum in der Doppelschichtigkeit der Regulation. Die *malK* Transkription ist abhängig von seinem Regulator MalT. Würde es nur eine EIIA^{Glc}-abhängige transkriptionale Regulation geben, so dürfte Glycerin auf die *crr* Mutante ET128 keinen Einfluss haben. Da aber noch eine posttranskriptionale Regulation existiert, wird die Menge an MalT in Anwesenheit von Glycerin auf dieser Ebene reduziert, was sich dann auf die Transkription von *malK* auswirkt.

Die Rolle der Adenylatcyclase wurde ebenfalls untersucht. Auch hier wurde eine Regulation auf zwei Ebenen gefunden. Der transkriptionale Einfluss von Glycerin und Xylose auf die *malT* Expression ist abhängig von der Anwesenheit des cAMP/CRP-Komplexes, denn in einer Δcya *crp** Mutante (ET24) konnte nicht mehr reprimiert werden (Tab. 6). Dagegen wurde in einer Mutante des selben Hintergrunds mit einer

translationalen *malT-lacZ* Fusion (ET25) eine Repression um den Faktor 3 (für Glycerin) bzw. 4,5 (für Xylose) gemessen. Dies lässt wiederum auf eine der Transkription folgenden Regulation schließen. Demnach gibt es zwei verschiedene Mechanismen wie Nicht-PTS Kohlenstoffe negativ auf das Maltosesystem einwirken können: eine cAMP- und EIIA^{Glc}-abhängige transkriptionale, sowie eine posttranskriptionale Repression. Die Existenz dieser beiden Regulationsebenen bei der Katabolitrepression stellt eine ganz neue und noch nie beschriebene Erkenntnis bei der Auflösung des Mechanismus dar und wurde im Folgenden weiter untersucht.

4.2 Die Rolle des cAMP/CRP-Komplexes

Ohne Zweifel besitzt die Adenylatcyclase eine wichtige Rolle bei der Katabolitrepression durch Nicht-PTS Kohlenstoffquellen. Dies zeigten die Ergebnisse der *crp** Mutanten deutlich (Tab. 6). Nun stellte sich die Frage nach der Funktion des cAMP Rezeptorproteins CRP. Ist dieses Protein bei dem Phänomen des Glycerineffekts ebenso beteiligt? Ein wichtiger Hinweis, dass die Anwesenheit des Regulatorkomplexes notwendig für eine Repression ist, ergab die Untersuchung einer cAMP/CRP-unabhängigen *malT-lacZ* Fusion. Hier ist die *malT* Expression durch zwei Mutationen (*malTp1 malTp10*) im Promotorbereich verstärkt und infolgedessen eine Transkription auch ohne Aktivator möglich. Wie in Tabelle 7 ersichtlich, konnte in dieser Mutante keine der getesteten Kohlenstoffquellen mehr einen Einfluss auf die *malT* Expression ausüben. Daher muss Glycerin und andere Nicht-PTS Zucker, sowie die ebenfalls getestete Glucose, auf den cAMP/CRP Komplex einwirken, wodurch es zu einer Repression katabolit-sensitiver Gene kommt.

Doch beeinflusst G3P den gesamten Regulatorkomplex oder nur cAMP? Um die Frage der CRP-Beteiligung zu beantworten, muss man sich zwei mögliche Ziele betrachten. Der erste Denkanatz basiert auf einer veränderten Affinität von cAMP zu CRP aufgrund von G3P. Dies hätte Auswirkungen auf die Aktivität des Transkriptionsregulators. Die zweite Möglichkeit wäre die Reduktion der Menge an cAMP Rezeptorprotein.

Es ist schon lange bekannt, dass die Bindung von cAMP an CRP die Transkription bestimmter Gene, hauptsächlich kataboler Systeme, aktiviert. Aufgrund von Ergebnissen aus spektroskopischen und chemischen Studien war sehr schnell klar, dass die Interaktion von cAMP mit seinem Rezeptorprotein eine Konformationsänderung bewirkt. Nur in dieser aktiven Konformation ist CRP befähigt an spezifische DNA Sequenzen zu binden und die Transkription in Anwesenheit der RNA-Polymerase zu

aktivieren. CRP* hingegen besitzt diese Struktur aufgrund des Austausches einer oder mehrerer Aminosäureresten auch ohne cAMP (Harman et al., 1986; Ren et al., 1988; Garges & Adhya, 1988; Krueger et al., 1998).

Binden nun aber Substanzen an CRP, die keine Konformationsänderung zur aktiven Struktur bewirken oder eine Interaktion mit dem Effektor cAMP verhindern, so führt dies zu einer Hemmung der CRP-Aktivität. Beispiele dafür sind in der Literatur zu finden. So wurde von Botsford und Mitarbeiter ein oder mehrere dialysierbare Moleküle in Zellextrakten aus in Glucose gewachsenen Zellen gefunden, welche die Affinität von CRP für cAMP herabsetzen. Sie postulierten, dass es sich hierbei um ein Stoffwechselintermediat des Glucoseabbaus handelt, konnten es aber nie identifizieren (Danley et al., 1977). Der sogenannte „*catabolite modulation factor*“ (CMF) (Ullmann et al., 1976; Dessein et al., 1978) wird ebenfalls als Faktor beschrieben, der bei wachsenden Zellen eine starke Repression (bis zu 95%) bei katabolit-sensitiven Genen bewirkt. cAMP/CRP-unabhängige Systeme sind hingegen nicht betroffen. Auch hier soll die Interaktion von cAMP und CRP beeinflusst werden.

Eine weitere interessante Beobachtung ist die Tatsache, dass z.B. cGMP ($K_{cGMP} = 2,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}$) mit einer zu cAMP ($K_{cAMP} = 3,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}$) vergleichbaren Bindekonstante an CRP bindet (Takahashi et al., 1980). Jedoch bewirkt die Interaktion keine Konformationsänderung und somit besitzt der cGMP/CRP Komplex keine Spezifität zu den CRP Boxen (Krakow & Pastan, 1973; Majors, 1975; Ebright et al., 1985).

Es wäre durchaus vorstellbar, dass G3P und andere Zuckerphosphate ebenfalls die Fähigkeit besäßen mit CRP zu interagieren. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten: Die Substanz bindet, wie cGMP, an der cAMP Bindestelle und verhindert eine Aktivierung des Regulators. Diese Konkurrenz müsste allerdings im Diagramm der relativen Fluoreszenzänderung in Abbildung 3 sichtbar werden. In diesem Experiment wurde die Konformationsänderung in Abhängigkeit von steigenden cAMP-Konzentrationen gemessen. Die Kurve der Messung in Anwesenheit von G3P ist zwar minimal nach oben verschoben, aber aufgrund der relativ hohen Streuung der Werte nicht relevant genug. Aus diesem Grunde kann von keiner Veränderung der Affinität durch G3P gesprochen werden.

Die zweite Möglichkeit wäre eine Bindung von G3P an einer anderen Stelle des Proteins. Für diese Allosterie wäre aber eine Konformationsänderung des CRP bei Zugabe von G3P notwendig, die über Fluoreszenzuntersuchungen auch nicht nachgewiesen werden konnte. Deshalb scheinen diese möglichen Mechanismen weitgehend unwahrscheinlich. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass G3P die DNA-Bindeaffinität des aktiven Komplexes beeinflusst. Weitere Probleme waren die unphysiologisch hohe cAMP-Konzentration (im mM Bereich), die zur Messung eingesetzt werden musste.

Und die Tatsache, dass nur die Bindung an die zweite, niederaffine cAMP-Bindestelle gemessen werden konnte (Passner & Steitz, 1997). Demzufolge sind keine Aussagen über die erste affine cAMP-Bindung zu machen.

Als zweiter Arbeitsansatz musste überprüft werden, ob G3P Einfluss auf die Menge des cAMP Rezeptorproteins ausübt. Von Aiba und Mitarbeitern wird postuliert, dass die intrazelluläre Konzentration an CRP als ein wesentlicher Faktor zur Modulation des klassischen Glucoseeffekts beiträgt (Ishizuka et al., 1993, 1994). Nach ihrer Meinung kann der Mechanismus nicht alleinig, wie man bisher immer meinte (Kolb et al., 1993), auf der Reduktion des cAMP-Spiegels beruhen. Ishizuka et al. zeigten, dass Glucose die Menge an *crp* m-RNA erniedrigt und folglich die CRP-Menge in der Zelle senkt (Ishizuka et al., 1994). Damit widerlegten die Autoren die Behauptung Guidi-Rontanis, dass der gesuchte Mechanismus nichts mit CRP zu tun hat (Guidi-Rontani et al., 1980). Auch der CRP* Spiegel in Δcya *crp** Mutanten wird durch Glucose beeinflusst (Tagami et al., 1995). Diese Senkung der CRP-Konzentration auf transkriptionaler Ebene korreliert mit der Wildtyp β -Galaktosidase Aktivität positiv. Steht *crp* unter der Kontrolle eines fremden Promotors, ist die Repression stark reduziert. Dieses Phänomen ist, so postulieren die Autoren, die Konsequenz aus der komplexen *crp* Regulation, welche abhängig von dem cAMP/CRP-Spiegel positiv und negativ durch den Komplex beeinflusst wird (Ishizuka et al., 1994; Hanamura & Aiba, 1992).

Dennoch scheint die Veränderung der CRP-Menge nicht der Mechanismus der Katabolitrepression durch Nicht-PTS Kohlenstoffquellen zu sein. In Western Blot Analysen wurde keine signifikante Reduktion der CRP bzw. CRP*-Konzentration in TB Glycerin Ansätzen der Stämme HS3084 (Abb. 4A) und ET23 (HS3084 Δcya *crp**) (Daten nicht gezeigt) gefunden.

Die Überexpression von CRP konnte die Glycerin-bedingte Repression der *malK-lacZ* Fusion im Stamm HS3084 Δcrp /pDCRP nicht aufheben (Abb. 4B), was für eine alleinige Rolle von cAMP spricht. In sensitiveren 2D-Gelen (Abb. 5) und im Western Blot der Zellen mit *crp* Plasmid (Abb. 4A) war zwar jeweils eine leichte Abnahme von CRP durch Glycerin zu erkennen, dies muss aber nicht auf einen direkten Einfluss dieser Substanz hindeuten. Viel wahrscheinlicher ist ein indirekter Effekt. Sinkt der intrazelluläre cAMP-Spiegel durch den Glycerineffekt, so führt dies zu einer verminderten Transkription aller cAMP/CRP-abhängiger Gene wie z.B. von *malT*, aber auch von *crp*. Da die *cya* Expression wiederum negativ durch den Regulatorkomplex reguliert wird, müsste sie sich unter normalen Umständen erhöhen. Da G3P einem cAMP-Anstieg entgegenwirkt, bleibt dies aber weitgehend ohne Auswirkung. Die CRP-Menge pendelt sich in einem etwas geringeren Pegel ein. Im Western Blot des CRP-Überexpressionsstamms, aber auch in den Wildtyp β -Galaktosidase Werten ließ sich die

Auswirkung dieser Autoregulation (Hanamura & Aiba, 1992) erkennen. Bei der Überproduktion von CRP in TB reduziert sich der cAMP-Spiegel etwas (Inada et al., 1991) und demzufolge auch die *malK* Expression. Im Experiment sank die spezifische β -Galaktosidase Aktivität der *malK-lacZ* Fusion in den TB-Kulturen um die Hälfte (Tab. 4B).

Auch Hogema et al. konnten für Glc6P, Lactose und Gluconat nur minimalste Auswirkungen auf die CRP-Konzentration nachweisen und schlossen daher zumindest eine alleinige Rolle dieses Proteins in der Repression durch Nicht-PTS Zucker ebenfalls aus (Hogema et al., 1997).

Die Resultate dieser Versuche fordern eine Rolle des cAMP zusammen mit dem Enzym IIA^{Glc} bei der Repression durch Glycerin und anderen Nicht-PTS Zuckern. CRP hingegen fällt keine direkte Bedeutung bei diesem Phänomen zu. Doch was ist der Mechanismus des Zusammenspiels dieser Komponenten?

4.3 Wie wirkt G3P auf die beteiligten Komponenten?

Die Adenylatcyclase katalysiert die Synthese von cAMP, welches zentrale Aufgaben im Metabolismus, bei der Signaltransduktion und in anderen zellulären Prozessen hat. Der cAMP-Spiegel wird in *E. coli* primär durch die Modulation der Adenylatcyclase Aktivität gesteuert. Es wird angenommen, dass dieses Enzym durch die phosphorylierte Form der PTS Komponente EIIA^{Glc} aktiviert wird (Saier & Feucht, 1975; Saier & Roseman, 1976; Nelson et al., 1982). Der Hauptmechanismus der klassischen Katabolitrepression in *E. coli* beinhaltet die Dephosphorylierung dieses Proteins. Diese Reaktion findet statt, wenn für den Transport von Substrat Phosphat abgezogen wird. Dies bedeutet bei Anwesenheit von PTS Zuckern eine Erniedrigung der cAMP-Synthese und somit die Repression vieler cAMP/CRP-abhängiger Systeme. Die cAMP-Phosphodiesterase Aktivität (Buettner et al., 1973) oder cAMP Ausscheidung (Epstein et al., 1975) scheinen keine zentrale Rolle zu spielen.

Die negative Regulation der Adenylatcyclase Aktivität durch G3P scheint, obwohl diese Kohlenstoffquelle nicht über das Phosphotransferase-System transportiert wird, trotzdem von EIIA^{Glc} abhängig zu sein. So wäre, in Anlehnung an das klassische Modell, die Veränderung des Phosphorylierungsgrads von EIIA^{Glc} durch G3P eine Erklärung für den Mechanismus des Glycerineffekts. Diese Substanz müsste direkt oder indirekt über weitere Faktoren entweder die Menge an $\text{EIIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ drastisch senken oder, was wahrscheinlicher ist, das Verhältnis von $\text{EIIA}^{\text{Glc}}/\text{EIIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ auf die Seite der

unphosphorylierten Form drücken. Dazu wäre eine G3P aktivier- oder induzierbare Phosphatase nötig.

Die alternative Hypothese besagte, dass G3P in die Aktivierung der Adenylatcyclase durch EIIA^{Glc}-P eingreift. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten und zwar indem G3P entweder mit EIIA^{Glc}-P oder mit der Adenylatcyclase selber interagiert. Das Ziel dieses Teilabschnittes der vorliegenden Arbeit war es zu überprüfen, welche der beiden Hypothesen die wahrscheinlichere ist.

4.3.1 Die Dephosphorylierung von EIIA^{Glc}-P ist nicht der Grund der Repression durch G3P

Durch eine spezielle Methode ist es relativ einfach möglich, die beiden EIIA^{Glc} Formen in einem Proteingel aufzutrennen. Hiermit konnte der EIIA^{Glc} Phosphorylierungszustand in verschiedenen isogenen Glycerin-Stoffwechselmutanten untersucht werden. Der Vergleich des Western Blots mit den spezifischen β -Galaktosidase Aktivitäten der *malT-lacZ* Fusion ergab eine wichtige Erkenntnis (Abb. 6). In allen Ansätzen, in denen eine Repression der *malT* Expression gemessen werden konnte, konnte gleichzeitig auch eine Dephosphorylierung des Enzyms EIIA^{Glc}-P nachgewiesen werden. Unphosphoryliertes Protein trat also im Wildtyp und in den Mutanten bei Anwesenheit von G3P immer auf. Während bei Glyceringabe alle, außer der Kinasemutante, Dephosphorylierung zeigten. Im Falle dieser *glpK* Mutation kann kein G3P mehr gebildet werden, welches für die Repression notwendig ist. In diesem und den TB Ansätzen wurde durch den Antikörper nur eine und zwar die EIIA^{Glc}-P Bande erkannt. Nur in der Dehydrogenasemutante (*glpD*, *glpR*) bildete sich auch ohne Zugabe der Substanzen geringe Mengen an unphosphoryliertem Protein. Dieser Stamm kann, bedingt durch seine *glpD* Mutation, kein G3P mehr abbauen und akkumuliert es im Innern. G3P entsteht, auch wenn kein Glycerin im Medium ist, aus Dehydroxyacetonphosphat über die NADH-abhängige G3P-Synthetase GpsA. Diese Reaktion stellt den Bedarf an G3P für die Phospholipidsynthese in der Zelle sicher. Die Auswirkung dieser Mediums-unabhängigen Akkumulation von G3P spiegelt sich zwar nicht sichtbar in der dazugehörigen *malT* Expression wider, doch muss man sich hierzu eine *malK*⁺-*lacZ* Fusion (HS3084) betrachten. In diesem Stamm ist eine verstärkte Repression zu messen, da hier indirekte Einflüsse über *malT* und direkte über *malK* zum Ausdruck kommen. Die spezifische Aktivität sinkt hier von 0,20 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ des Wildtyps auf 0,06 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ der *glpD* Mutante (Diplomarbeit Eppler, 1997).

In Abbildung 7 ist die Zeitabhängigkeit der Dephosphorylierung zu sehen. Auffällig ist die Schnelligkeit (schon nach 0,5 min) in der dephosphoryliertes Protein im Wildtyp auftauchte nachdem G3P zugegeben wurde. Dies spricht gegen eine mögliche *de novo* Synthese einer EIIA^{Glc}-P Phosphatase, hingegen würde die Zeit für die Aktivierung einer bereits existierenden Phosphatase durch G3P ausreichen. Nach 10 min nahm die Menge an unphosphoryliertem EIIA^{Glc} wieder geringfügig ab, um dann gleich zu bleiben. D.h. Zellen, die in TB/ G3P wuchsen, zeigten keine erneute Reaktion auf G3P. Hier blieb die EIIA^{Glc}-Bande immer gleich stark (Abb. 7A). In der *glpD* Mutante war wieder, wie im vorangegangenen Experiment schon, zum Zeitpunkt Null nicht-phosphoryliertes EIIA^{Glc} in der Zelle. Weitere G3P Gaben blieben ohne Folgen (Abb. 7B).

Obwohl mit den bisherigen Ergebnissen eine Korrelation zwischen der Repression durch G3P und der Dephosphorylierung von EIIA^{Glc}-P festzustellen ist, war jedoch die Reduktion der Menge an aktivierenden EIIA^{Glc}-P zu gering, um Auswirkungen auf die Adenylatcyclase Aktivität zu haben. Es wird davon ausgegangen, dass das unphosphorylierte EIIA^{Glc} auf die Adenylatcyclase keinen Einfluss hat. Durch EIIA^{Glc} Mutationen im katalytischen Zentrum konnte dies demonstriert werden (Reddy & Kamireddy, 1998). Da die Wirkung von Glycerin auf die *malT* Transkription verhältnismäßig hoch ist, muss ein anderer Grund, als die beobachtete Dephosphorylierung von EIIA^{Glc}-P, für den Glycerineffekt verantwortlich sein.

4.3.2 Die Hemmung der Interaktion zwischen EIIA^{Glc}-P und der Adenylatcyclase

Für den gesuchten Mechanismus der Repression durch G3P kommt die zweite Hypothese in Frage. Sie konzentriert sich auf die Hemmung der Interaktion zwischen der Adenylatcyclase und EIIA^{Glc}-P durch G3P. Der experimentelle Beweis sollte durch eine Adenylatcyclasemutante erbracht werden, die in dem für die Aktivierung durch EIIA^{Glc}-P wichtigen Bereich deletiert ist.

Die Adenylatcyclase kann grob in zwei Domänen aufgeteilt werden. Es gibt eine N-terminale katalytische Domäne und einen regulatorischen Bereich im C-Terminus (Roy et al., 1983; Holland et al., 1988). Der regulatorische Teil des Proteins soll inhibitorische Wirkung auf die Aktivität des aktiven Zentrums besitzen. Dieser Effekt könnte bei der Aktivierung des Enzyms durch EIIA^{Glc}-P aufgehoben werden (Crasnier et al., 1994). Ebenfalls gilt der C-Terminus als Ziel des Glucoseeffekts (Roy et al., 1983) und eines CRP-abhängigen Phänomens (Takahashi et al., 1998). In *crp* Mutanten kann man einen Anstieg der cAMP-Synthese beobachten, der in PTS-defizienten Stämmen reduziert ist

(den Blaauwen & Postma, 1985; Crasnier & Danchin, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der PTS Komponente um EIIA^{Glc} handelt. Ebenfalls über die Erniedrigung der Menge an phosphorylierten EIIA^{Glc} soll ein bisher unbekanntes CRP-abhängiges Protein auf die Adenylatcyclase Aktivität wirken. Versuche dieses unbekannte Protein zu reinigen scheiterten jedoch an der schwindenden Dephosphorylierungsaktivität während der Reinigungsschritte (Takahashi et al., 1998). Es könnte sich hierbei um die vorher postulierte Phosphatase handeln. Deletiert man den C-terminalen Bereich der Adenylatcyclase, so ist dieser *crp* Phänotyp verschwunden (Crasnier & Danchin, 1990; Crasnier et al., 1994; Takahashi et al., 1998).

Da sich *in vitro* Studien mit *E. coli* Adenylatcyclase aufgrund der geringen spezifischen Aktivität des gereinigten Proteins sehr schwer gestalten (Yang & Epstein, 1983; Reddy et al., 1989), musste zur Überprüfung hinsichtlich des Glycerineffekts wieder auf die indirekte Methode der Aktivitätsbestimmung einer *malt-lacZ* Fusion zurückgegriffen werden. Hierzu wurde eine Adenylatcyclasemutante verwendet, der 48 Aminosäuren im C-Terminus fehlen. Sie wird als Mutante beschrieben, in der das vorher erläuterte CRP-abhängige Phänomen nicht mehr funktioniert (Takahashi et al., 1998). Im folgenden Versuch wurde anfangs davon ausgegangen, dass die Adenylatcyclase in dieser Mutante, aufgrund der C-terminalen Deletion, eine Aktivität besitzt, die unabhängig von der Stimulierung durch EIIA^{Glc}-P ist. In diesem Fall dürfte eine durch Glucose verursachte Senkung des EIIA^{Glc}-P Spiegels keine Hemmung der cAMP-Synthese auslösen. Wenn das Modell, dass G3P die Interaktion zwischen EIIA^{Glc}-P und der Adenylatcyclase hemmt, stimmt, dürfte auch durch Zugabe von Glycerin oder G3P keine Repression der *malt* Expression in dieser Mutante zu beobachten sein. Es wurde daher die spezifische β -Galaktosidase Aktivität der *malt-lacZ* Fusion in der Adenylatcyclasemutante ET190 in TB und TB mit Zusatz von G3P, Glycerin bzw. Glucose bestimmt (Tab. 10).

Die Grundaktivität der *malt-lacZ* Fusion in der Mutante in TB war im Vergleich zum Wildtyp Bre1161 mit einer Erniedrigung um das 3,5fache überraschend klein. Dies macht wenig Sinn, wenn man davon ausgeht, dass der deletierte Bereich der Adenylatcyclase sich wirklich negativ auf das katalytische Zentrum auswirkt. Denn dann würde man höhere oder zumindest gleiche β -Galaktosidase Aktivitäten erwarten. Zur Erklärung könnte man anführen, dass zur Aufhebung der inhibitorischen Wirkung der C-Domäne die Deletion möglicherweise zu klein ist. So wäre es durchaus denkbar, dass zwar die positive Interaktion mit dem Effektor EIIA^{Glc}-P reduziert ist, aber der negative Einfluss der regulatorischen Domäne nicht völlig aufgehoben wird. In anderen Arbeiten deuteten Mutageneseversuche darauf hin, dass D414 eine wichtige Aminosäure für die Aufhebung der inhibitorischen Interaktion der beiden Bereiche ist (Crasnier & Danchin, 1990; Crasnier et al., 1994). Diese Asparginsäure ist jedoch in der hier verwendeten Mutante

noch vorhanden, da die Deletion nur die letzten 48 Aminosäuren betrifft. Geringe aktivierende Wirkung muss EIIA^{Glc}-P jedoch noch besitzen, da sich die *malT-lacZ* Expression durch eine zusätzliche *crr* Mutation (ET196) nochmals senken ließ (Tab. 10).

Falls G3P wirklich die Aktivierung der Adenylatcyclase durch EIIA^{Glc}-P beeinflusst, dürfte keine oder nur sehr geringe Repression der *malT-lacZ* Expression zu beobachten sein. Dies traf auch zu. Die spezifische β -Galaktosidase Aktivitäten der Fusion in Tabelle 10 zeigen, dass G3P auf die Adenylatcyclasemutante gar keinen Einfluss mehr hatte. Glucose hingegen bewirkt noch eine 3fache Repression der *malT-lacZ* Expression. Die Werte des Glucose Ansatzes unterstützen die mögliche Erklärung der zu kleinen Deletion, da beim Glucoseeffekt von einer Reduktion der EIIA^{Glc}-P Menge ausgegangen wird.

In Folge der beschriebenen Ergebnisse ist es am wahrscheinlichsten, dass G3P mit EIIA^{Glc}-P interagiert und somit die Aktivierung der Adenylatcyclase beeinflusst. Mit diesem Modell lässt sich auch die in Kapitel 4.1 erwähnte Beobachtung deuten. In diesem Experiment war festzustellen, dass bei EIIA^{Glc} Überproduktion die Repression durch G3P etwas geringer war (Tab. 9). In Zellen, die verminderte Mengen an cAMP aufwiesen, ist der G3P Transport reduziert (Diplomarbeit, Eppler, 1997). Da unter diesen Versuchsbedingungen (EIIA^{Glc}-Überproduktion) aber sehr viel und schnell EIIA^{Glc} synthetisiert wird, ist es möglich, dass mehr Protein durch G3P unbeeinflusst bleibt. Die Aktivität der Adenylatcyclase wäre etwas höher und als Folge die Repression etwas kleiner.

Die Interaktion von G3P mit Enzym IIA^{Glc} könnte auch dessen Phosphorylierung behindern und somit die Entstehung der geringen Mengen an unphosphoryliertem Protein im Western Blot (Abb. 6/ 7) in Gegenwart von Glycerin und G3P im Medium erklären. Demnach könnte die anfangs diskutierte Beeinflussung des Phosphorylierungsgrads des Enzyms IIA^{Glc} eine Folge der Interaktion mit G3P sein.

4.4 Der Charakter der posttranskriptionalen Regulation

4.4.1 Die translationale Regulation ist pH-abhängig, jedoch unabhängig von cAMP und EIIA^{Glc}

Der Glycerineffekt zeigt viele Gemeinsamkeiten zur Katabolitrepression der PTS Zucker. In beiden Fällen wird über das PTS System der cAMP-Spiegel der Zelle beeinflusst. Doch immer mehr Hinweise deuten darauf hin, dass der postulierte cAMP-abhängige Mechanismus nicht der einzige Vermittler des Glucoseeffekts ist. In Gram positiven Bakterien, wie z.B. *Bacillus subtilis*, gibt es sogar ausschließlich eine cAMP-unabhängige Katabolitrepression. Ferner existieren auch in *E. coli* Gene, die nur cAMP-unabhängig durch Glucose reprimiert werden. Dies wurde für die Putreszinamintransferase, die Pyrrolindehydrogenase (Shaibe et al., 1985), aber auch für einige Gene von anaeroben Enzymen beschrieben (Reams & Clark, 1988).

Desweiteren ist der pleiotrope Regulator Cra (früher FruR) zu nennen, der die Richtung des metabolen Kohlenstoffflusses reguliert (für eine Übersicht siehe Saier, 1996). Seine Rolle als möglicher Angriffspunkt des G3P wurde schon früher untersucht. Doch konnte keinerlei Beteiligung nachgewiesen werden, da seine Abwesenheit keine Auswirkung auf den Glycerineffekt zeigte (Diplomarbeit, Eppler, 1997).

In dieser Arbeit konnte die Existenz eines cAMP-unabhängigen Regulationsmechanismus, dem zumindest das *mal*-Regulon unterworfen ist, bewiesen werden. Wie im Ergebnisteil (Kapitel 3.1) gezeigt und in Kapitel 4.2 diskutiert wurde, ist diese Repression unabhängig von cAMP und EIIA^{Glc}. Es muss sich dabei um einen posttranskriptionalen Mechanismus handeln, der in Zusammenhang mit Katabolitrepression noch nie zuvor beschrieben wurde.

Der Metabolismus von Glycerin, sowie von Xylose, verursacht eine deutliche Reduktion der Translation. Gemessen wurde diese Repression in einem Stamm mit einer translationalen *malT-lacZ* Fusion (POP3506) (Tab. 5 und 6). Das entstehende MalT-LacZ Hybridprotein ist sehr groß und könnte möglicherweise Stabilitätsproblemen unterworfen sein. Es ist bekannt, dass regulatorische Proteine des öfteren proteolytisch instabil sind. Ihre Anfälligkeit für den Abbau spielen häufig eine Hauptrolle in ihrer Regulation (Miller, 1996). Einflüsse solcher Art konnten jedoch weitgehend ausgeschlossen werden. Denn in Zellen des Stammes POP3506, deren Proteinbiosynthese durch Chloramphenikol gehemmt wurde, wurde das Hybridprotein aufgrund von Glycerin nicht schneller abgebaut als im Kontrollansatz ohne Supplement

(Abb. 8). Dieses Ergebnis wurde anhand von β -Galaktosidase Tests (Abb. 8) und Western Blot Analysen erbracht (Daten nicht gezeigt).

Der Mechanismus dieser translationalen Repression ist pH-abhängig. Dies begründet sich im Wesentlichen auf folgende Beobachtung: Bestimmt man die pH-Werte von TB-Übernachtskulturen (ET23 in Tab. 16), fällt auf, dass der pH des neutralen, ungepufferten Mediums während des Wachstums leicht alkalisch wird (pH 8,5). Ist jedoch Glycerin als zusätzliche Kohlenstoffquelle vorhanden, säuert das Medium zu einem pH von 4,5 an. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der Produktion von CO_2 , das ausreichend ist um TB auf diesen pH zu bringen. Es entsteht in *E. coli* unter aeroben Bedingungen, wenn keine alternativen Elektronenakzeptoren vorhanden sind. Diese Ansäuerung ist zwingend notwendig für den Glycerin-abhängigen Einfluss auf die Translation. In Tabelle 18 sind Daten zusammengefasst, die dies bestätigen. In Phosphat-gepuffertem MMA mit Aminosäuren als Kohlenstoffquelle vermag Glycerin die Expression einer translationalen *malT-lacZ* Fusion auf die Hälfte zu senken. Schließt man aber die transkriptionale Regulation auf *malT* aus, indem man eine $\Delta\text{cya crp}^*$ Mutante (ET25) untersucht, so ist keine Repression mehr zu beobachten. Die Effekte auf transkriptionaler Ebene sind pH-unabhängig und daher sind die Repressionsfaktoren der transkriptionalen *malT-lacZ* Fusion in einer MMA Kultur mit denen in ungepuffertem TB vergleichbar. Die translationale Regulation hingegen tritt bei konstantem pH nicht mehr auf. Durch künstliche Erniedrigung des Medium-pHs konnte jedoch weder im Stamm POP3506 (translationale *malT*-Fusion) noch in dem $\Delta\text{cya crp}^*$ Derivat eine Repression der *malT-lacZ* Expression bewirkt werden (Tab. 19). Das bedeutet, dass die beobachtete Reduktion der *malT* mRNA Translation nur bei einem Absinken des Medium-pHs und gleichzeitigem Glycerinstoffwechsel stattfindet. Die Ansäuerung des Wachstumsmediums ist demnach Voraussetzung, aber nicht Grund der translationalen Repression.

Dieses Resultat widerspricht den Arbeiten von Heyde et al. Diese Autoren postulierten darin, dass die Expression sogenannter *phm* Gene von dem externen pH im Wachstumsmedium moduliert wird. Diese pH-abhängigen Gene wurden aufgrund einer *in vivo* Fusionstechnik mit Hilfe eines *phoA*-Transposons identifiziert und näher untersucht. Zu dieser Gruppe gehört, neben Genen für einige Proteine der äußeren Zellmembran (z.B. OmpF und LamB), auch *malT* (Heyde & Portalier, 1987; Alonzo et al., 1998). Die Autoren fanden u.a. heraus, dass die *malT-phoA* Fusion auf die Erniedrigung des externen pHs mit einer reduzierten Expression reagiert (Heyde et al., 1991; Alonzo et al., 1998).

4.4.2 Die Verhinderung einer posttranskriptionalen Repression durch verschiedenste Mutationen

Ein weiterer Ansatz zur Charakterisierung der translationalen Regulationsebene war eine Insertionsmutagenese. Hierfür wurde der cAMP-unabhängige Stamm ET23/pLamB (HS3084 Δcya crp^* $lamB^+$) verwendet. Aufgrund seiner translationalen $malk^+$ - $lacZ$ Fusion ist dieser Stamm auf X-Gal Indikatorplatten blau, in Anwesenheit von Glycerin jedoch hellblau. Mit Hilfe eines Mini-Tn10::Cam tragenden λ -Phagens sollten Insertionsmutanten erhalten werden, die von Glycerin unbeeinflusst auf den Indikatorplatten blau bleiben. Das Ziel war weitere Komponenten zu finden, die eine Rolle in der posttranskriptionalen Repression durch Glycerin spielen. Die erhaltenen vier Mutanten (ET211, ET212, ET130, ET131), zusammen mit weiteren Stämmen aus Vorversuchen (ET213, ET214, ET215) wurden durch Sequenzierung der an das Transposon angrenzenden DNA identifiziert.

Die Analyse der Mutante ET215 ergab, dass die Insertion im letzten Gen des $glpFKX$ Operons (Truninger et al., 1992) lokalisiert ist. GlpX wird als Fructose-1,6-Bisphosphatase II beschrieben. Jedoch konnte bisher keine physiologische Rolle dieses Enzyms gefunden werden. Eine Mutation in fbp , dem Gen für die Fructose-1,6-Bisphosphatase I, konnte durch GlpX nicht komplementiert werden. Doch scheint eine funktionelle Bedeutung trotzdem sicher, da Mutanten, die in der Glykolyse aufgrund einer $pfkA$ (Phosphofruktokinase A) Mutation gestört sind, ohne GlpX sehr viel langsamer wachsen (Donahue et al., 2000).

ET214 ist eine $narU$ Mutante. Die Genprodukte des Operons $narUZYWV$ sind an der Nitratregulation der Zelle beteiligt. Das Protein NarU wird durch seine Homologie zu NarK als Nitrat/ Nitrit Antiporter beschrieben, während NarZYWV eine von zwei membrangebundenen Quinol: Nitrat Oxidoreduktasen in *E. coli* ist (Rowe et al., 1994).

Sie wird konstitutiv exprimiert, obwohl sie sicher nicht die Hauptreduktase ist. Die physiologische Rolle ist noch unklar (für ein Review siehe Bonnefoy & Demoss, 1994). Aufgrund der Tatsache, dass das Transposon im ersten Gen des Operons sitzt ist wahrscheinlich die ganze Einheit betroffen.

Die letzten Mutanten in dieser Reihe zeichneten sich durch einen MMA^- Phänotyp aus, d.h. sie waren auxotroph. Wie sich nach der Sequenzierung herausstellte, konnten sie Purine nicht mehr *de novo* synthetisieren. Durch die Blockade in dem Purinbiosyntheseweg akkumulierten aromatische Verbindungen, die ins Medium abgegeben wurden und für eine bräunliche Verfärbung verantwortlich waren. Beim ersten Klon handelte es sich um eine $purT$ Mutante (ET212). Das Gen ist bei 41,5 min des *E. coli*

Chromosoms lokalisiert. Die GAR (5'-Phosphoribosylglycinamid)-Transformylase PurT katalysiert die Formylierung von GAR zu FGAR. Eine Mutation in *purT* resultiert in einem stark verminderten Wachstum auf Minimalmedium (Tab 12) (Zalkin & Nygaard, 1996). Das monomere Protein zeigt keine Identität zu der zweiten GAR Transformylase PurN, dafür jedoch zu PurK (27%).

Das Gen dieses Enzyms (PurK) wurde in einem weiteren Klon (ET130) getroffen. Es liegt zusammen mit *purE* in einem Operon bei 11,9 min. Die beiden Gene sind translational gekoppelt, da das Translations-Terminations-Codon von *purE* mit dem Translations-Initiations-Codon von *purK* um 4bp überlappen. *purK* codiert für eine NCAIR (5'-Phosphoribosyl-5-Carboxyaminoimidazol)-Synthetase (Tiedeman et al., 1989; Watanabe et al., 1989). Zusammen mit PurE, der NCAIR-Mutase, katalysieren sie die Carboxylierung von AIR (5'-Phosphoribosyl-5-Aminoimidazol) zu NCAIR (Mueller et al., 1994).

Der Purin-Repressor (PurR) ist das Hauptregulatorprotein des *pur* Regulons. Er gehört zur LacI/ GalR Repressorfamilie und koordiniert die Expression der *pur* Gene hinsichtlich des Angebots an Purinen. Als Corepressor werden Hypoxanthin und Guanin diskutiert. Das Gen ist bei 37,5 min des *E. coli* Genoms zu finden (Rolfes & Zalkin, 1988). Im Promotorbereich von *purR* ist auch das Transposon des Klons ET131 lokalisiert. Da die Mutation eine Purinauxotrophie verursacht, ist anzunehmen, dass das Gen nicht ausgeschaltet ist. Ansonsten wären alle Gene des *pur* Regulons konstitutiv. Das Transposon ist hier höchstwahrscheinlich für eine erhöhte Genexpression, ausgehend von dem IS10R Promotor (P_{out}), verantwortlich (Ciampi et al., 1982; Simons et al., 1983; Wang & Roth, 1988). Eine Überexpression des Repressorproteins würde zu Purinmangel und verlangsamten Wachstum, verursacht durch eine ständige Repression der *pur* Gene, führen (Zalkin & Nygaard, 1996).

Da bei der Mutagenese mehrmals unabhängig voneinander Gene der Purinbiosynthese getroffen wurde, wurde die Rolle von Purinen bei der posttranskriptionalen Repression durch Glycerin näher untersucht.

4.4.3 Welche Rolle haben die Purine?

Purinbasen sind wichtige Bausteine in der Zelle. Sie sind in DNA, Energieträgern wie ATP oder in Alarmonen wie cAMP oder ppGpp zu finden. Purine werden in *E. coli* *de novo* synthetisiert oder von Aussen aufgenommen, d.h. auf Vollmedien können Purinauxotrophe Mutanten wachsen. Erst auf Minimalmedium machen sich die meisten

Mutationen im Syntheseweg bemerkbar (Tab. 12). Die Synthese von Purinen beginnt bei Ribose-5-Phosphat und endet bei IMP (Inosin-5'-Monophosphatidoimidazol), das zu GMP und AMP umgewandelt wird. Diese drei Substanzen können beliebig ineinander überführt werden.

Die Expression aller Purinsynthesegene werden durch den Repressor PurR reguliert. Der Repressor wirkt verschieden stark auf das *pur* Regulon. Die Repressionsfaktoren variieren zwischen 11 und 17. Auf die Gene deren Produkte für die Synthese von IMP zu AMP und GMP notwendig sind hat der Repressor jedoch geringeren Einfluss (Faktor 3 - 5) (für einen Überblick siehe Zalkin & Nygaard, 1996). Hier spielen noch andere bisher relativ unklare Faktoren eine Rolle (He & Zalkin, 1994; Tesfa-Selase & Drabble, 1992). Diese Regulation erlaubt eine Verwertung von Purinen aus dem RNA-Abbau bzw. aus dem Medium. Denn Purin-auxotrophe Mutanten, wie ET130, können ihren gesamten Purinbedarf auch über Aufnahme der verschiedensten Komponenten von Außen decken z.B. durch Nukleoside wie Guanosin. In *E. coli* existieren zwei hoch affine Transportsysteme für Nukleoside. Zum einen das G-System, codiert durch *nupG*, zum anderen das C-System, NupC (Munch-Petersen & Mygind, 1976; Westh & Hansen et al., 1987). Ersteres transportiert alle Nukleoside, während NupC spezifisch für Pyrimidine und Adenosine ist (Munch-Petersen & Mygind, 1983).

Um Erkenntnisse über den Mechanismus der translationalen Regulation zu erhalten, wurde die *purK* Mutante ET130 einigen Untersuchungen unterzogen. Plasmid-codiertes PurK konnte den Glycerin-unabhängigen Phänotyp von ET130 wieder aufheben. Während der Stamm mit leerem Plamid durch Glycerin nicht reprimiert wurde, sank die *malK* Expression im *purK*⁺ Stamm in Gegenwart von Glycerin wieder 2,3fach ab (Tab.14). Kurz gesagt, der Phänotyp ist an *purK*-gekoppelt. Da *purK* hinter *purE* im Operon liegt, bleibt letzteres von der Insertion unbeeinflusst.

Doch scheint das Phänomen der Verhinderung einer posttranskriptionalen Repression durch Glycerin nicht im Fehlen der NCAIR-Synthetase zu liegen, da auch andere Purinmutanten, wie z.B. *purT*, den gleichen Phänotyp zeigen. Eine direkte Rolle aller dieser Enzyme ist unwahrscheinlich. Die Ursache scheint vielmehr in einem Purinmangel der Zellen begründet zu sein. Die Supplementationsversuche mit Guanosin, das über NupG in die Zellen transportiert wird, konnte diese Annahme bestätigen. In den Mutanten wurde bereits bei Konzentrationen von 0,1mM des Nukleosids wieder eine Repression durch Glycerin beobachtet. In den Ansätzen mit 0,5 und 1mM Guanosin wurden Repressionsfaktoren vergleichbar mit denen des Ausgangsstamms ET23 erreicht (Tab.13).

Doch was bewirkt dieser Purinmangel? Diese Frage wurde durch die Bestimmung des pHs im Medium beantwortet. Der posttranskriptionale Glycerineffekt ist abhängig von

einer Ansäuerung des Wachstumsmediums durch den Metabolismus von Glycerin. Verhindert man diese pH-Erniedrigung, so wird die Repression aufgehoben. Genau dies passiert in einer *purK* Mutante. Wie die Daten in Tabelle 17 eindeutig zeigen, blieb der pH einer ET130 Kultur nach Wachstum in Gegenwart von Glycerin im neutralen Bereich, während er im Medium des Ausgangsstammes auf 4,5 sank. Dieser pH-Wert konnte durch Zugabe von Guanosin wieder erreicht werden. Hingegen blieb der pH in MMA Kulturen auch mit Guanosin konstant (Tab. 16) und die *malk⁺-lacZ* Fusion durch Glycerin unbeeinflusst (Tab. 15). Zusammenfassend ist zu sagen, dass Purinmangel die Ansäuerung des Mediums in Anwesenheit von Glycerin verhindert. Jedoch bleibt der Mechanismus dieses Phänomens weitgehendst offen. Zur Klärung bieten sich zwei Möglichkeiten an, die im folgenden diskutiert werden sollen.

4.4.4 Der mögliche Grund für die Stabilisierung des pHs in Purinmutanten

Alarmone sind kleine Moleküle, die als Botenstoffe in Bakterienzellen fungieren. Sie vermitteln zumeist zwischen vielen verschiedenen Signalen und einer spezifischen Reaktion. In früheren Arbeiten wurden immer wieder Alarmone in Verbindung mit Katabolitrepression diskutiert. Gleichfalls spielen sie eine Rolle bei der Erkennung von Mangelerscheinungen, aber auch bei pH-, oxidativem oder Hitzeschock.

Viele von ihnen haben die Purinbasen Guanin oder Adenin als Baustein, so dass die Konzentration dieser Alarmone in Purinbiosynthesemutanten herabgesetzt sein müsste. Aus diesem Grund wäre eine Rolle von Alarmonen bei der pH-abhängigen Signaltransduktion nicht von der Hand zu weisen.

Allerdings konnte die Beteiligung des bekanntesten Beispiels dem Modulator cAMP in den vorangegangenen Kapiteln schon ausgeschlossen werden. Ebenso unwahrscheinlich ist eine Funktion von ppGpp an der Repression. Diese Substanz ist u.a. für die stringente Kontrolle in *E. coli* verantwortlich und wird als Signalmolekül nicht nur für Aminosäure-, sondern auch bei Phosphat- und Kohlenstoffmangel diskutiert (Cashel et al., 1996). Die Synthese findet durch das *relA* Genprodukt, die ppGpp-Synthetase, statt (Haseltine & Block, 1973; Cochran & Byrne, 1974). Da alle verwendeten Stämme jedoch kein *relA* besitzen, kommt auch dieses Signalmolekül wahrscheinlich nicht in Frage. Es ist trotzdem aber auch nicht ganz auszuschließen. Denn obwohl SpoT als eine ppGpp-Degradase beschrieben ist (Sarubbi et al., 1989), gibt es Hinweise für eine Synthetaseaktivität des Enzyms (Xiao et al., 1991) und somit wäre eine mögliche Akkumulation von ppGpp, auch in einem *relA* Stamm, nicht völlig abwegig.

Die Bedeutung von AppppA, eines weiteren Alarmons, welches hauptsächlich bei Hitzeschock und pH- bzw. oxidativem Stress auftritt, konnte im Versuch widerlegt werden. Das aufgestellte Modell besagte, dass Glycerin aufgrund der Ansäuerung des Mediums durch CO₂ Produktion einen pH-Stress auslöst, der die Zelle veranlasst den AppppA Spiegel zu erhöhen. Die Diadenosintetraphosphat Synthese wird durch eine Aminoacyl-tRNA Synthetasen katalysiert (Goerlich et al., 1982). Es ist bekannt, dass unter Stress-Bedingungen AppppA an Hitzeschockproteine wie ClpB und DnaK bindet und ihre Aktivität moduliert (Bochner et al., 1986; Johnstone & Farr, 1991). Letzteres Protein wurde auch schon in Verbindung mit Maltoseregulation beschrieben (Promotionsarbeit Peist, 1997) und wäre somit ein guter Kandidat für die Vermittlung weiterer Reaktionen. Darüberhinaus wurde durch Farr et al. die Existenz einer Repression kataboler Systeme durch hohe Mengen an AppppA veröffentlicht (Farr et al., 1989). Wäre nun, verursacht durch eine *pur* Mutation, der Alarmon Spiegel niedrig, so fände diese Repression nicht mehr statt. Eine Erklärung für den stabilen pH solcher Purin-auxotrophen Kulturen konnte dieses Modell jedoch nicht liefern.

Im Versuch wurde durch ein *apaH* Plasmid der AppppA-Spiegel künstlich erniedrigt und der Effekt auf die Repression beobachtet. Das Gen *apaH* codiert für eine Hydrolase, die AppppA als Substrat erkennt und abbaut (Mechulam et al., 1985). Es konnte jedoch trotzdem eine Repression durch Glycerin gemessen werden (Tab. 15). Auch die Untersuchung einer *dnaK* Mutante blieb ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt), so dass die Beteiligung von AppppA beim Glycerineffekt unwahrscheinlich ist. Aufgrund der Tatsache, dass die physiologische Bedeutung der Alarmone noch weitgehend unverstanden ist und bei weitem auch noch nicht alle Substanzen charakterisiert sind, ist eine Rolle von noch unbekanntem Signalmolekülen bei der translationalen Regulation durch Glycerin trotzdem nicht zu falsifizieren.

Die zweite Erklärung für die Aufhebung des translationalen Glycerineffekts war energetischer Natur. Vergleicht man die Wachstumskurven von ET23 und ET130 miteinander, dann fällt auf, dass in der Purinmutante die Generationszeit verlängert ist und die Zellen bei einer geringeren optischen Dichte in die stationäre Phase eingehen (Abb. 9). Im Gegensatz zum Ausgangsstamm (ET23) tritt bei der Mutante ET130 keine Veränderung durch Glyceringabe mehr ein. Diese interessante Beobachtung kann man u.a. mit einem erniedrigten ATP- und GTP-Spiegel in Purinmutanten erklären. Es ist bekannt, dass der Purin NTP-Pool die rRNA Transkriptionsrate kontrolliert, da NTPs wichtig für die Stabilisierung der Interaktion zwischen der RNA-Polymerase und des P1 Promotors der *rrn* Operone sind. Ist dieser Komplex instabil, hat dies eine verringerte Translation zur Folge. Die Zellen wachsen langsamer, und die Effektivität der Zuckerverwertung ist herabgesetzt. In der untersuchten *purK* Mutante kann daher das

Glycerin nicht effektiv genug verwertet werden, und es kommt zu fast keiner pH-Erniedrigung. Die Voraussetzung für die translationale Repression ist nicht mehr gegeben.

Alle der isolierten und in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Mutanten, *pur* als auch Nicht-*pur* Mutanten, zeigten keinen Glycerin-bedingten translationalen Einfluss auf das Maltosesystem mehr. Dieses Phänomen ist die einzige Gemeinsamkeit, die zu finden war. Daher könnte man schlußfolgern, dass auch die nicht weiter untersuchten Nicht-*pur* Mutationen (*glpX* und *narU*) ein schlechteres Wachstum bedingen und somit eine Ansäuerung des externen pHs verhindern.

4.5 Die Auswirkungen von Nicht-PTS Kohlenstoffquellen auf die Zelle

4.5.1 Die pleiotrophe Regulation durch Nicht-PTS Kohlenstoffe

Die Beobachtung, dass Zucker, die nicht über das PEP-abhängige Phosphotransferase System transportiert werden, Katabolitrepression und „Inducer Exclusion“ verursachen können gibt es schon länger. Für die „Inducer Exclusion“ konnte ein EIIA^{Glc}-vermittelter Mechanismus gezeigt werden (Hogema et al., 1998a). Er scheint vom Metabolismus der Nicht-PTS Zucker abhängig zu sein, da dieser das Verhältnis von PEP/ Pyruvat verändert. Gerade dieses Verhältnis korreliert mit der Dephosphorylierung von EIIA^{Glc}-P durch die Zucker. Doch konnte mit diesem Modell nicht der Einfluss auf die Adenylatcyclase Aktivität erklärt werden, da das PEP/ Pyruvat Verhältnis in keiner Relation zu dem cAMP-Spiegel stand (Hogema et al., 1998b).

In einer anderen Hypothese wird der Transport von Glc6P und anderen Zuckerphosphaten durch UhpT für den EIIA^{Glc}-vermittelten Einfluss auf die Adenylatcyclase Aktivität verantwortlich gemacht. Die Regulatoren UhpA,B,C sollen dabei keine Rolle spielen und auch sonst ist der Mechanismus relativ unklar (Dumay et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte für Nicht-PTS Zucker Einflüsse auf die Adenylatcyclase Aktivität nachgewiesen werden. Das Ausmaß dieses regulatorischen Netzwerkes ist erstaunlich umfangreich. In Zusammenarbeit mit Dr. Völker konnte der umfassende Einfluss von Glycerin auf das Muster der in der Zelle synthetisierten Proteine gezeigt werden (Abb. 10). Neben der zu erwartenden Induktion durch Glycerin,

wahrscheinlich vornehmlich von *glp* Genen (weiße Pfeile), kann man in Abbildung 10 auch die starke Auswirkungen des Glycerineffekts sehen (schwarze Pfeile). Zehn der prominentesten Proteine, deren Menge im TB/ Glycerin-Ansatz reduziert vorlagen, wurden identifiziert. Sie konnten, mit zwei Ausnahmen, in zwei Hauptklassen eingeteilt werden. In der ersten Gruppe sind periplasmatische Bindeproteine von ABC Transportsystemen, wie dem Galaktose, Glutamin oder dem Oligopeptid System. Auch das Maltose-Bindeprotein MalE ist unter den identifizierten Proteinen vertreten.

Die zweite Klasse bilden Enzyme des Tricarbonsäurezyklus, wie die Citrat-Synthase (GltA). Dieses hexamer-aufgebaute Enzym (Weitzman, 1981;) bildet aus Acetyl-CoA und Oxalacetat Citrat. Ebenfalls identifiziert wurden die Enzyme der nächsten beiden Reaktionen. Und zwar ist das erstens eine der Aconitasen (AcnB), die für die Isomerisierung des Citrats zum Isocitrat zuständig ist und zweitens die Isocitrat-Dehydrogenase (Icd), die 2-Oxoglutarat produziert. Die beiden letzten Proteine dieser Klasse sind die β -Untereinheit der Succinatthiokinase (SucC) und die Malatdehydrogenase (Mdh). Die Succinatthiokinase ist ein $\alpha_2\beta_2$ Tetramer (Nishimura, 1986) und katalysiert die Reaktion von Succinyl-CoA zu Succinat. Die dimere Malatdehydrogenase (Hall et al., 1992) dehydriert die sekundäre Alkoholgruppe des Malats, wobei wieder Oxalacetat für die Citrat-Synthasereaktion entsteht.

Die Enzyme des Tricarbonsäurezyklus werden transkriptional durch zwei globale Regulationssysteme kontrolliert: dem Zweikomponentensystem ArcA/B und der klassischen Katabolitrepression (Ronson et al., 1987; Lin & Iuchi, 1991). Durch die cAMP/CRP abhängige Expression der Gene sind sie natürlich auch dem Glycerineffekt unterworfen.

Zwei der Proteine konnten keiner der beiden Gruppen zugeteilt werden. Das erste ist Dps (oder auch PexB). Es handelt sich hierbei um ein 18kD großes, Membran-assoziiertes Polypeptid (Schultz et al., 1988). Es wird als DNA-Bindeprotein beschrieben, das bei der Ausbildung der generellen Resistenzmechanismen unter Hungerbedingungen beteiligt ist (Almiro et al., 1992). Die Induktion der *dps* Transkription wird bei Kohlenstoffmangel und osmotischem Schock durch σ^S , bei oxidativem Stress durch σ^{70} kontrolliert. Zusätzlich gibt es eine posttranskriptionale Regulation unter Stickstoffmangel Bedingungen (Lomovskaya et al., 1994). Der extreme Unterschied der Dps-Mengen in TB und TB/ Glycerin dürfte neben der cAMP-Abhängigkeit des σ^{70} Promotors noch einen weiteren Grund haben. Es ist bekannt, dass die Dps-Synthese in der frühen Hungerphase induziert wird (Groat et al., 1986). Aufgrund des verschiedenen Kohlenstoffangebots in den beiden Kulturen, tritt dies im TB Ansatz schneller ein, als im Ansatz mit zusätzlichem Glycerin und demzufolge sind auch die Proteinkonzentrationen verschieden. Das letzte identifizierte Protein ist eine

NAD⁺-abhängige Aldehyddehydrogenase (AldA) (Sridhara & Wu, 1969). Aerob oxidiert dieses Enzym z.B. L-Lactaldehyd komplett zu L-Lactat (Caballero et al., 1983). Da diese Dehydrogenase noch nicht ausführlich biochemisch charakterisiert ist, ist es durchaus vorstellbar, dass auch noch andere Aldehyde als Substrat dienen (Heim & Strehler, 1991). Induktor ist Hydroxyaldehyd und 2-Oxoglutarat. Die *aldA* Expression hängt zusätzlich von DnaA und CRP ab (Limon et al., 1997). Unter anaeroben Bedingungen wird die Regulation von ArcA-P, dem phosphorylierten „Response-Regulator“ des ArcB/A Zweikomponenten Systems, übernommen (Pellicer et al., 1999). In fast allen Fällen sind Gene betroffen, die cAMP/CRP abhängig transkribiert werden. Mit Ausnahme von *glnH* und *oppA*, für die keine cAMP/CRP-Abhängigkeit in der Literatur beschrieben wird. Das Gen für das Glutamin-Bindeprotein besitzt zwei Promotoren: einen σ^{70} -abhängigen, konstitutiven und stromabwärts einen σ^{54} -Promotor mit einer Bindestelle für den Stickstoffregulator NtrC-P. Die Transkription wird bei Stickstoffmangel induziert (Nohno et al., 1986). Auch für *oppA* ist kein cAMP/CRP-abhängiger Promotor beschrieben. Unter Phosphatmangel fungiert PhoB-P als Repressor der *oppA* Transkription. Desweiteren haben Alanin- und Leucinreste und anaerobe Wachstumsbedingungen eine erhöhte Expression zur Folge. Warum die Expression dieser Proteine durch Glycerin reprimiert wird ist unklar.

Doch trotzdem zeigt dieser Versuch eindrucksvoll, dass nicht nur das Maltosesystem, sondern wahrscheinlich alle cAMP/CRP abhängigen Gene vom Glycerineffekt betroffen sind. Es handelt sich hierbei um einen pleiotrophen Effekt.

4.5.2 Die Rolle der phosphorylierten Kohlenstoffe

Die vorangegangenen Untersuchungen beschäftigten sich bisher mit dem Einfluss von G3P auf das Maltosesystem, wobei der Mechanismus zu großen Teilen aufgeklärt werden konnte. Da gerade die phosphorylierte Form die repressorische Substanz darstellt, könnten auf diese Weise auch andere Zuckerphosphate, wie z.B. Glc6P die cAMP-Synthese beeinflussen.

Das allgemeine Muster einer Bindung von Zuckerphosphaten an ein Protein ist in der Katabolitrepression bei Gram-positiven Bakterien verwirklicht. In *Bacillus megaterium* wird, wie in sehr vielen Gram-positiven Bakterien, die Katabolitrepression u.a. durch das Regulatorprotein CcpA (Henkin et al., 1991) zusammen mit der Operatorsequenz *cre* (Weickert & Chambliss, 1990) vermittelt (Review Hueck & Hillen, 1995). CcpA ist ein Repressor der LacI/ GalR Familie, der - an *cre* gebunden - die Transkription vieler

katabolit-sensitiver Gene verhindert (Hueck et al., 1994). Meist hat die an Serin-46 phosphorylierte PTS Komponente HPr die Funktion des Corepressors. In *Bacillus megaterium* kann unter bestimmten Bedingungen diese Rolle aber auch von Glc6P übernommen werden. Im Versuch führt die Aktivierung von CcpA durch die zwei Effektoren zur Erkennung von verschiedener DNA-Sequenzen des *xyl* Promotors (Gösseringer et al., 1997).

Es gibt auch Hinweise, dass die Phosphatgruppe von Zuckern bei der „Selbstkatabolitrepression“ eine wichtige Rolle spielt. Dieser Begriff wurde von Katz & Englesberg vor langer Zeit geprägt und steht für das Phänomen, dass Zucker auch die Induktion ihres eigenen Systems reprimieren können. Für den Einfluss auf die Arabinosegene konnte durch die Autoren eine Abhängigkeit von der L-Ribulokinase (AraB) nachgewiesen werden (Katz & Englesberg, 1971). Sie phosphoryliert L-Ribulose, das beim Arabinoseabbau entsteht, ATP-abhängig zu L-Ribulose-5-Phosphat (Lee & Bendet, 1967).

Um eine übermäßige Induktion des Systems zu vermeiden, setzt wahrscheinlich auch G3P in hohen Konzentrationen seine eigene Bildung herab (Zwaig et al., 1970). Für weitere induzierbare, katabole Systeme wurde diese „Selbstkatabolitrepression“ ebenfalls beschrieben. Und zwar waren dies z.B. die Zucker Rhamnose (Power, 1967), Maltose (Schwartz, 1967) oder Galaktose (Soffer, 1961). Es ist anzunehmen, dass es sich bei dem Mechanismus um den in dieser Arbeit beschriebenen handelt, zusammen mit Einflüssen der „Inducer Exclusion“ (Hogema et al., 1999).

Die Frage nach der Allgemeingültigkeit des für den Mechanismus aufgestellten Modells sollte an weiteren Beispielen überprüft werden. Die ersten Untersuchungen wurden mit Xylose durchgeführt. Dieser Zucker scheint durch den gleichen Mechanismus wie G3P zu reprimieren. Es gibt eine cAMP-abhängige transkriptionale, sowie eine translationale Regulation (Tab. 6). Wahrscheinlich ist auch in diesem Fall eine Phosphorylierung des Zuckers notwendig. Dies muss man aus dem Ergebnis einer Insertionsmutagenese schließen. In diesem Experiment wurde eine Xylosekinasemutante (*xylB*) bei der Suche nach Stämmen erhalten, die durch Xylose in ihrer Transkription unbeeinflusst bleiben (Tab. 22). Der Grund dafür, dass keine weitere Xylosemutante gefunden wurde, könnte zum einen daran liegen, dass Mutanten im weiteren Abbauweg schwer zu erhalten sind. Zum anderen wohl aber auch, weil ein weiterer Metabolismus ausgehend von Xylulose-5-Phosphat (Xyl5P) gar nicht notwendig für eine Repression ist. Dieses XylB Reaktionsprodukt ist ein zentrales Metabolit, das ebenfalls bei dem Abbau von Arabinose, Ribose, Ribitol und Arabitol anfällt. Auf diese Weise kann eine repressorische Substanz für viele katabole Wege wirken.

Diese Aussagen konnten durch Galaktosemutanten untermauert werden. Galaktose ist ein Zucker, der die *malT* Expression und somit das ganze *mal* Regulon stark beeinflusst (Faktor 3,2; Tab. 23). Er gelangt über zwei Transporter, GalP und MglBCA, ins Cytoplasma, wo er durch die Kinase GalK phosphoryliert wird. Galaktose-1-Phosphat (Gal1P) steht mit Glucose-1-Phosphat (Glc1P) durch GalT (Gal1P-Uridyltransferase) im Gleichgewicht. Fehlt dieses Enzym so bewirkte die Zugabe von Galaktose keine Repression mehr. Dies galt ebenso für eine *pgm* Mutante. Die Phosphoglucomutase (Pgm) katalysiert die nächstfolgende Reaktion von Glc1P zu Glc6P. Die in Tabelle 23 gezeigten Daten beweisen, dass weder Gal1P noch Glc1P die repressorische Substanz sein kann, sondern Glc6P das gesuchte Zuckerphosphat ist. Denn erst wenn dieser Stoff in der Zelle gebildet werden kann, vermag Galaktose zu reprimieren. Ein weiterer Abbau z.B. zu Fructose-6-Phosphat, das nächste Produkt im Abbauweg, ist nicht notwendig. Dieser Schritt wird durch das Glykolyseenzym Pgi (Phosphoglucoisomerase) katalysiert. Ein in diesem Enzym mutierter Stamm kann aufgrund der Tatsache, dass wenige Prozent des Stoffwechsels über den Pentosephosphat-Weg laufen immer noch wachsen (Fraenkel, 1996). Man müsste aber in der Stärke der Repression erkennen, wenn ein weiterer Metabolismus für die Repression durch Galaktose wichtig wäre, da dieser sehr reduziert ist. Das ist aber nicht der Fall, da die Repressionsfaktoren im Wildtyp (Bre1161) und der *pgi* Mutante (ET187) mit Werten von 3,2 und 2,8 ähnlich hoch sind (Tab. 23).

Glc6P spielt, wie Xyl5P, wiederum eine sehr zentrale Rolle im Abbauweg von Zuckern, wie Galaktose, Meliobiose und Lactose. Demzufolge scheint es evident, dass zentrale Zuckerphosphate die Katabolitrepression auslösen.

Die Regulation läuft meist über EIIA^{Glc} (Tab. 25). Fehlte diese Komponente, so war Xylose, Galaktose und Gluconat nicht mehr fähig die transkriptionale *malT-lacZ* Expression zu senken. Für Glc6P konnte dies nicht eindeutig gezeigt werden. Hier fiel die β -Galaktosidase Aktivität der Fusion trotz *crr* Mutation von 0,07 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ auf 0,04 ab. Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass Glc6P noch andere EIIA^{Glc}-unabhängig Einflüsse auf die Transkription hat. Gerade für Glc6P ist dieses Ergebnis erstaunlich, da dieses Zuckerphosphat starke Dephosphorylierung der EIIA^{Glc}-P Komponente verursacht (Hogema et al., 1998). Sie liegt bei Glc6P, laut Hogema et al., bei 71%, während bei Galaktose, vergleichbar mit Glycerin, nur etwa 20% des Proteins dephosphoryliert vorliegt. Eine Idee des möglichen weiteren Mechanismus könnte jedoch die schon kurz erwähnte Hypothese von Dumay et al. (1996) erbringen. Diese Autoren untersuchten die intrazellulären cAMP-Konzentrationen in Anwesenheit verschiedener Zuckerphosphate. Sie beobachteten eine Korrelation zwischen dem Transport von Zuckerphosphaten via UhpT und der cAMP-Synthese und schlossen

daraus, dass die Transportaktivität etwas mit der Repression dieser Kohlenstoffe zu tun haben muss. So wäre es durchaus möglich, dass Glc6P ein zusätzlichen EIIA^{Glc}-P-unabhängigen Einfluss auf die Adenylatcyclase Aktivität hat.

4.6 Ein mögliches Modell für die Katabolitrepression durch Nicht-PTS Kohlenstoffquellen

In Bakterien existieren die verschiedensten Kontrollinstanzen, die eine übermäßige Induktion verhindern (z.B. „Selbstkatabolitrepression“) oder bei Anwesenheit einer bestimmten Kohlenstoffquelle im Medium andere Zucker-verwertende Systeme reprimieren (z.B. Katabolitrepression). Durch ein Wechselspiel von Induktion und Repression wird so eine optimale Menge an Enzymen sichergestellt, um die in natürlichen Habitaten raren Kohlenstoffquellen ökonomisch zu nutzen. In der Natur kommt es oft vor, dass ein Bakterium mit nur einer Kohlenstoffquelle konfrontiert wird, die es gilt so effektiv wie möglich zu verwerten. Die Induktion von katabolen Systemen, deren Substrat nur in Spuren vorhanden sind oder die weniger Energie bringen, muss daher vermieden werden. Diese Regulation ist vielschichtig.

Kaum eine Kohlenstoffverbindung ermöglicht ein schnelleres Wachstum in *E. coli* als Glucose. Um den bevorzugten Verbrauch der PTS Zucker zu gewährleisten, gibt es die klassische Katabolitrepression. Sie verhindert die Expression anderer kataboler Systeme, indem es den cAMP/CRP-Spiegel herabsetzt und die Bildung oder den Transport von Induktor inhibiert. Erst wenn die PTS Zucker verbraucht sind, werden alternative Kohlenstoffquellen genutzt. Es wäre unsinnig hier nicht auch eine Rangfolge des Verbrauchs einzubauen. Steht eine Kohlenstoffquelle, im Vergleich zu den restlichen im Medium vorhandenen, in großen Mengen zur Verfügung, wäre es überflüssig eine energetisch kostspielige Synthese von Enzymen zu betreiben, die gar nichts mit der Metabolisierung dieses Stoffes zu tun haben. Dieses Phänomen ist die Katabolitrepression durch Nicht-PTS Zucker. Anhand der diskutierten Daten lässt sich zusammenfassend ein mögliches Modell dieser Regulation aufstellen. Eine schematische Zusammenfassung des postulierten Mechanismus ist in Abbildung 11 dargestellt.

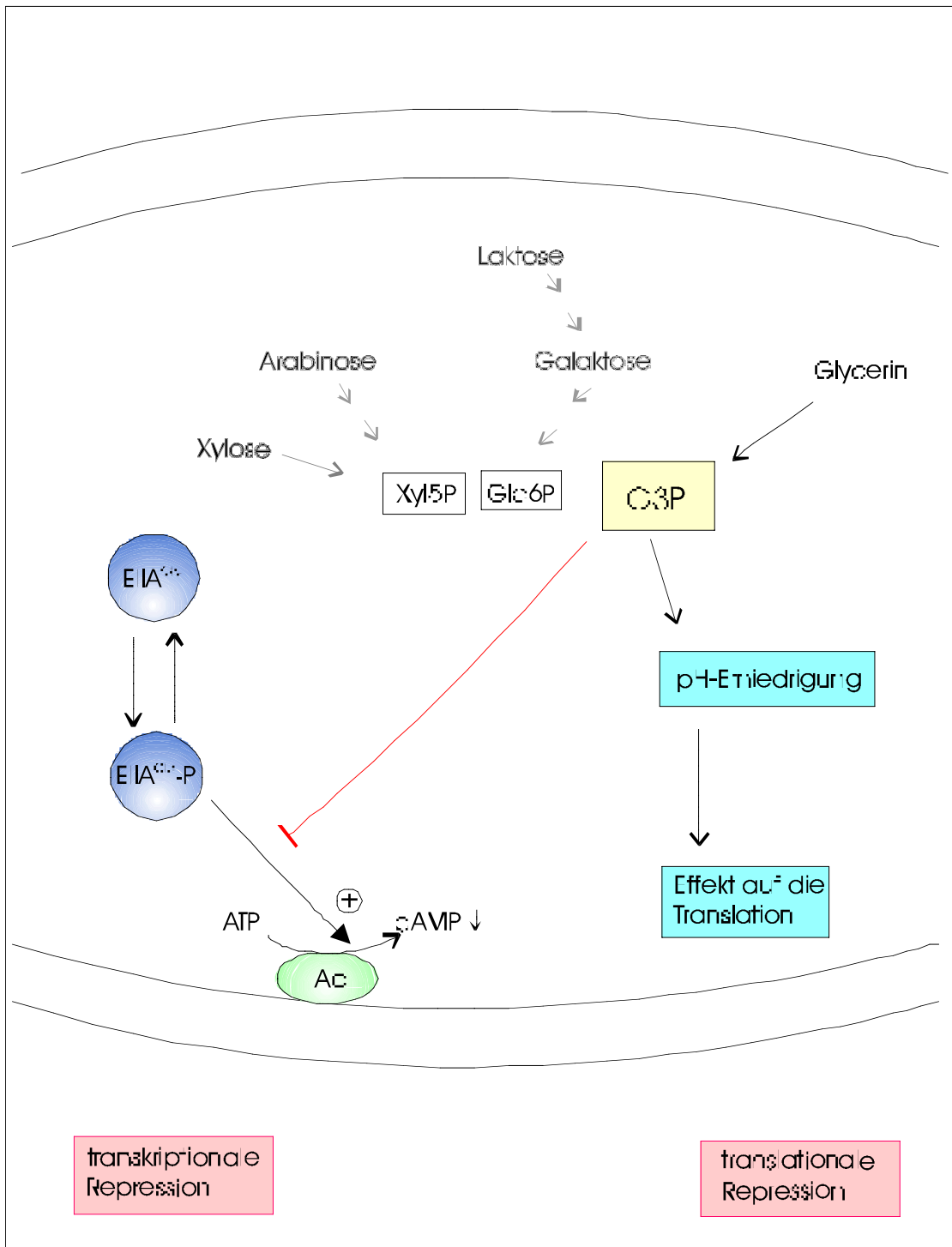


Abbildung 11 : Mögliches Modell der Katabolitrepession durch Nicht-PTS Kohlenstoffquellen

Schematisch dargestellt ist der Mechanismus der transkriptionalen Repression durch G3P bzw. Glc6P und Xyl5P. Diese Substanzen beeinflussen die Aktivierung der Adenylatcyclase (Ac) durch EIIA^{Glc}-P und verursachen somit eine Senkung des cAMP-Spiegels. Die translationale Regulation ist abhängig von einer pH-Erniedrigung. Doch sind die beteiligten Komponenten noch unbekannt.

Das „Signal“ für die Anwesenheit dieser Kohlenstoffquellen ist die jeweilige Phosphatverbindung, wie G3P für Glycerin oder Glc6P für Galaktose, Meliobiose und Lactose. Xyl5P wird als die repressorische Substanz bei Wachstum auf Arabinose, Xylose und Ribose postuliert. Als „Rezeptor“ der Signaltransduktion dient das PTS Enzym IIA^{Glc}. Die Zuckerphosphate interagieren mit diesem Protein. Die Folge ist ein Anstieg an unphosphoryliertem EIIA^{Glc}, da wahrscheinlich seine Phosphorylierung durch HPr-P gestört wird. Der Hauptgrund der Repression ist allerdings nicht die kleine Verschiebung des Verhältnisses zwischen der phosphorylierten und der unphosphorylierten Form, sondern liegt wohl eher an der Beeinflussung der Adenylatcyclase Aktivierung. Hier ist die Vorstellung, dass das G3P oder Glc6P gebundene EIIA^{Glc}-P die Adenylatcyclase nicht genügend aktivieren kann. Dies kann entweder an der Bildung eines instabilen Komplexes liegen oder unter Umständen an der Konkurrenz von G3P mit Orthophosphat, das für die Aktivierung benötigt wird, begründet sein. Die Inhibition der Adenylatcyclase führt zu einer Erniedrigung des cAMP/CRP-Spiegels und letztendlich zur Repression katabolit-sensitiver Systeme. Nun hängt die Expression der jeweiligen Systeme von der Anwesenheit des Induktors ab.

Neben diesem Einfluss auf die Transkription gibt es noch eine translationale Regulation. Sie ist bedingt durch die Erniedrigung des pHs in Kulturen, die eine Kohlenstoffquelle im Überschuss zur Verfügung haben. Diese pH-Veränderung dient als Signal weiterer bisher unbekannter Reaktionen, die die Translation beeinflussen. Der Sinn liegt wohl in der Verhinderung einer durch Induktion bedingten Überexpression bestimmter Gene. So kommt es bei Überangebot an Kohlenstoffquellen zur Akkumulation toxischer Phosphatverbindungen oder zu einer Überladung der Glykolyse. Unter diesen Bedingungen wird verstärkt Methylglyoxal gebildet, das in der Zelle akkumuliert (Cooper & Anderson, 1970), da es nicht mehr so schnell zu Pyruvat abgebaut werden kann. In höheren Konzentration wirkt dieses α -Ketoaldehyd jedoch cytotostatisch oder sogar toxisch (Ackerman et al., 1974), da es die Translation hemmt (Fraval & McBrian, 1980). Die cytotoxische Natur dieses Stoffes macht es notwendig, dass es zahlreiche Kontrollmechanismen zur Verhinderung der Akkumulation in *E. coli* gibt. Eine davon könnte die translationale Regulation sein.

Die Diskussion dieses komplexen Mechanismus lässt erkennen, wie vielschichtig das Regulationsnetzwerk in Bakterien ist. Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse machen eine Erweiterung und unter Umständen eine Erneuerung des klassischen Begriffs der Katabolitrepression unumgänglich.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Katabolitrepression des Gram-negativen Bakteriums *Escherichia coli*. Katabolitrepression ist das Phänomen, der Hemmung der Genexpression induzierbarer, kataboler Systeme durch die Anwesenheit bestimmter anderer Kohlenstoffquellen im Medium.

Solche Kohlenstoffe sind PTS Zucker, wie z.B. Glucose oder Mannose. Sie werden durch das PEP-abhängige Phosphotransferasesystem (PTS) transportiert und gleichzeitig phosphoryliert. Die Phosphatgruppe stammt von PEP und wird zuerst über die generellen PTS Proteine, Enzym I und HPr, später über das Zucker-spezifische Enzym II auf das Zuckermolekül übertragen.

Neben der Aufgabe des Transports besitzt das Phosphotransferasesystem eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion der klassischen Katabolitrepression. Der Mechanismus dieser Regulation ist gut untersucht, wenn auch noch nicht im Detail verstanden. Der Phosphorylierungsstatus der Glucose-spezifischen PTS Komponente EIIA^{Glc} spielt in diesem Prozess eine entscheidende Rolle. Unphosphoryliertes EIIA^{Glc} ist befähigt an Proteine zu binden, die im Transport (z.B. MalK) oder dem Stoffwechsel (z.B. GlpK) der Nicht-PTS Kohlenstoffquellen (wie Maltose, Glycerin oder Xylose) involviert sind. Auf diese Weise kann es den Stoffwechsel und die Entstehung von Induktor dieser Systeme verhindern. Das Phänomen wird aus diesem Grund auch „Inducer Exclusion“ genannt. Die phosphorylierte Form des EIIA^{Glc} ist dagegen wahrscheinlich für die Aktivierung der Adenylatcyclase verantwortlich. Da dieses Enzym cAMP aus ATP synthetisiert, betrifft eine Modulation der Aktivität die Transkription vieler cAMP/CRP-abhängiger Gene. Somit führt die durch Transport von PTS Zuckern verursachte Dephosphorylierung von EIIA^{Glc} zur „Inducer Exclusion“ und zur Erniedrigung des cAMP-Spiegels in der Zelle, das zur Katabolitrepression führt.

Jedoch gibt es schon längere Zeit die Beobachtung, dass auch Kohlenstoffquellen, die nicht über das PTS transportiert werden, Katabolitrepression verursachen können. Dieses Phänomen war bis vor kurzem noch nahezu unverstanden. In vorangegangenen Untersuchungen wurde als Modellsystem der Einfluss von Glycerin auf das Maltosesystem von *E. coli* gewählt. Frühere Ergebnisse zeigten, dass Glycerin negativ auf die Expression kataboler Systeme, wie das Maltosesystem, einwirken kann. Die phosphorylierte Form G3P vermittelt diese Repression und es ist kein weiterer Glycerinmetabolismus notwendig. Das Ziel des Glycerineffekts, wie dieses Phänomen genannt wurde, ist in diesem Fall in erster Linie das Aktivatorprotein MalT. Durch diese Eigenschaft besitzt G3P Einfluss auf das gesamte Maltoseregulon.

In der hier vorliegenden Promotionsarbeit sollte ein Modell für den Mechanismus dieser neuartigen Form der Katabolitrepression erstellt werden. Die Adenylatcyclase und das Enzym IIA^{Glc} spielen auch hier die Hauptrolle. Dies konnte durch Messungen der Expression von *mal-lacZ* Fusionen in Mutanten bewiesen werden, die zum einen im Gen für EIIA^{Glc} (*crr*) deletiert waren; zum anderen in Stämmen, die kein cAMP synthetisieren dafür aber eine konstante Menge an cAMP-unabhängigem CRP* exprimieren. Die Stämme zeigten keine Glycerin-bedingte transkriptionale Repression, genauso wenig wie eine Mutante, die ein cAMP/CRP-unabhängiges *malT* besitzt (*malTp1 malTp10* Mutante). Wird G3P in der Zelle gebildet, so sinkt der Spiegel an aktivem cAMP/CRP-Komplex. Jedoch ist das Rezeptorprotein CRP kein direktes Ziel von G3P und auch eine Erhöhung der CRP-Menge hat keine Folgen, sondern alleinig die Aktivität der Adenylatcyclase ist betroffen.

Untersuchungen des Phosphorylierungszustands des Enzyms IIA^{Glc} zeigten eine geringfügige G3P-abhängige Dephosphorylierung. Es ist eher unwahrscheinlich, dass diese schwache Dephosphorylierung der Grund einer solch starken Repression ist. Vielmehr sprechen weitere Ergebnisse für ein Modell, das die Beeinflussung der Interaktion zwischen der Adenylatcyclase und dem Enzym $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ vorsieht. In einer Adenylatcyclasemutante, deren $\text{EIIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ Interaktionsdomäne deletiert ist, konnte Glycerin respektive G3P nahezu nicht mehr reprimieren. Es ist anzunehmen, dass G3P mit $\text{EIIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ interagiert und somit eine Aktivierung der cAMP-Synthese verhindert. Darüberhinaus erschwert es wahrscheinlich die Phosphorylierung von EIIA^{Glc} durch HPr-P, wodurch geringe Mengen an unphosphoryliertem EIIA^{Glc} entstehen.

Im Laufe der Untersuchungen wurde außerdem eine zweite, noch nicht beschriebene posttranskriptionale Regulationsebene entdeckt. Der Mechanismus ist von cAMP und EIIA^{Glc} unabhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die pH-Erniedrigung, die im ungepuffertem Medium in Anwesenheit von Glycerin oder G3P auftritt für das Phänomen von großer Bedeutung ist. Verhindert man die Ansäuerung z.B. durch Puffern des Mediums, so findet keine translationale Repression mehr statt.

Versuche durch Insertionsmutagenese Komponenten dieser Regulation zu finden, führte zur Isolierung verschiedenster Mutanten. Auffällig waren die relativ häufige Anzahl an Mutationen im *de novo* Purinbiosyntheseweg. Die detaillierte Charakterisierung einer dieser Mutante (*purK*) erbrachte jedoch keine weitere Vorstellung über den Mechanismus, da der Phänotyp durch die Stabilisierung des pHs bedingt war. Der Grund hierfür war wahrscheinlich die Herabsetzung des Wachstums und der Stoffwechsellistung, die durch den Purinmangel hervorgerufen wurden.

Der dritte Teil der Untersuchungen beschäftigte sich mit der Allgemeingültigkeit des aufgestellten Modells. Es scheint, dass auch bei anderen Nicht-PTS Zuckern die

phosphorylierte Form entscheidend für die Repression ist, während ein weiterer Stoffwechsel nicht notwendig ist. So wies z.B. die Expression einer *malT-lacZ* Fusion in Galaktose-Stoffwechselmutanten darauf hin, dass Galaktose via Glc6P auf das Maltosesystem repressorisch einwirkt. Auch für Xylose ist ein Zuckerphosphat als Auslöser der Repression zu erwarten.

Das Phänomen der Katabolitrepression durch Nicht-PTS Kohlenstoffe hat einen pleiotrophen Charakter und beeinflusst zentrale Stellen des Zuckerstoffwechsels. Wie zweifelsfrei dargestellt werden konnte, verändert der Zusatz von Glycerin ins Medium das Muster der synthetisierten Proteine in der Zelle stark. Die Identifikation einiger Proteine, deren Menge in Anwesenheit dieses Stoffes stark abnahm, zeigte, dass sowohl Gene für Transportprozesse (periplasmatische Bindeproteine), als auch für zentrale Stoffwechselwege (Tricarbonsäurezyklus) von der Repression betroffen sind.

- Ackerman, R. S., Cozzarelli, N. R. & Epstein, W. (1974).** Accumulation of toxic concentrations of methyl glyoxal by wild-type *E. coli* K12. *J Bacteriol* **119**, 357-362.
- Adhya, S. & Schwartz, M. (1971).** Phosphoglucosyltransferase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **108**, 621-6.
- Aiba, H. (1983).** Autoregulation of the *Escherichia coli* *crp* gene: CRP is a transcriptional repressor for its own gene. *Cell* **32**, 141-9.
- Aiba, H. (1985).** Transcription of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene is negatively regulated by cAMP-cAMP receptor protein. *J Biol Chem* **260**, 3063-70.
- Aiba, H., Fujimoto, S. & Ozaki, N. (1982).** Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res* **10**, 1345-61.
- Aiba, H., Mori, K., Tanaka, M., Ooi, T., Roy, A. & Danchin, A. (1984).** The complete nucleotide sequence of the adenylate cyclase gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **12**, 9427-40.
- Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D. & Kolter, R. (1992).** A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**, 2646-54.
- Alonzo, S., Heyde, M., Laloi, P. & Portalier, R. (1998).** Analysis of the effect exerted by extracellular pH on the maltose regulon in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **144**, 3317-25.
- Amann, E., Ochs, B. & Abel, K. J. (1988).** Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**, 301-15.
- Amin, N. & Peterkofsky, A. (1995).** A dual mechanism for regulating cAMP levels in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 11803-5.
- Bell, A., Gaston, K., Williams, R., Chapman, K., Kolb, A., Buc, H., Minchin, S., Williams, J. & Busby, S. (1990).** Mutations that alter the ability of the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein to activate transcription. *Nucleic Acids Res* **18**, 7243-50.
- Berg, O. G. & von Hippel, P. H. (1988).** Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. II. The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *J Mol Biol* **200**, 709-23.

- Bibi, E. & Kaback, H. R. (1990).** In vivo expression of the lacY gene in two segments leads to functional lac permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4325-9.
- Bochner, B. R., Zylicz, M. & Georgopoulos, C. (1986).** Escherichia coli DnaK protein possesses a 5'-nucleotidase activity that is inhibited by AppppA. *J Bacteriol* **168**, 931-5.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L. & Boyer, H. W. (1977).** Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95-113.
- Bonnefoy, V. & Demoss, J. A. (1994).** Nitrate reductases in Escherichia coli. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**, 47-56.
- Boos, W. & Eppler, T.** Procaryotic Binding Protein-dependent ABC Transporters. In *Microbial Transport Systems*. Edited by Winkelmann. Weinheim: WILEY-VCH.
- Boos, W. & Lucht, J. M. (1996).** Periplasmic binding protein-dependent ABC transporters. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium; cellular and molecular biology*, pp. 1175-1209. Edited by F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & H. E. Umbarger. Washington, DC: American Society of Microbiology.
- Boos, W., Peist, R., Decker, K. & Zdych, E. (1996).** The maltose system of *Escherichia coli*. In *Regulation of gene expression in Escherichia coli*, pp. 201-229. Edited by E. C. C. Lin & A. S. Lynch. Austin, Texas: R. G. Landes Company.
- Boos, W. & Shuman, H. (1998).** Maltose/maltodextrin system of Escherichia coli: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 204-29.
- Botsford, J. L. & Drexler, M. (1978).** The cyclic 3',5'-adenosine monophosphate receptor protein and regulation of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate synthesis in Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **165**, 47-56.
- Botsford, J. L. & Harman, J. G. (1992).** Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* **56**, 100-22.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.

- Bremer, E., Silhavy, T. J. & Weinstock, G. M. (1985).** Transposable lambda placMu bacteriophages for creating lacZ operon fusions and kanamycin resistance insertions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **162**, 1092-9.
- Buettner, M. J., Spitz, E. & Rickenberg, H. V. (1973).** Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **114**, 1068-73.
- Bukau, B., Ehrmann, M. & Boos, W. (1986).** Osmoregulation of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **166**, 884-91.
- Caballero, E., Baldoma, L., Ros, J., Boronat, A. & Aguilar, J. (1983).** Identification of lactaldehyde dehydrogenase and glycolaldehyde dehydrogenase as functions of the same protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **258**, 7788-92.
- 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**, 541-555.
- Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V. J., and Vinella, D. (1996).** The Stringent Response. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. pp. 1458-1496. Edited by F. C. Neidhardt, Curtiss, R., III, Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H. E., eds. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.
- Chapon, C. (1982).** Expression of malT, the regulator gene of the maltose region in *Escherichia coli*, is limited both at transcription and translation. *Embo J* **1**, 369-74.
- Chapon, C. (1982).** Role of the catabolite activator protein in the maltose regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **150**, 722-9.
- Chapon, C. & Kolb, A. (1983).** Action of CAP on the malT promoter in vitro. *J Bacteriol* **156**, 1135-43.
- Charpentier, B. & Branlant, C. (1994).** The *Escherichia coli* gapA gene is transcribed by the vegetative RNA polymerase holoenzyme E sigma 70 and by the heat shock RNA polymerase E sigma 32. *J Bacteriol* **176**, 830-9.
- Choy, H. E. (2000).** The study of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate-mediated transcription regulation in vitro using a coupled transcription- translation system. *J Biol Chem* **275**, 6783-9.

- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989).** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175.
- Ciampi, M. S., Schmid, M. B. & Roth, J. R. (1982).** Transposon Tn10 provides a promoter for transcription of adjacent sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5016-20.
- Clark, D. P., Cunningham, P. R., Reams, S. G., Mat-Jan, F., Mohammedkhani, R. & Williams, C. R. (1988).** Mutants of *Escherichia coli* defective in acid fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* **17**, 163-73.
- Clausen, T., Schlegel, A., Peist, R., Schneider, E., Steegborn, C., Chang, Y. S., Haase, A., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D. & Boos, W. (2000).** X-ray structure of MalY from *Escherichia coli*: a pyridoxal 5'-phosphate- dependent enzyme acting as a modulator in mal gene expression. *Embo J* **19**, 831-42.
- Cochran, J. W. & Byrne, R. W. (1974).** Isolation and properties of a ribosome-bound factor required for ppGpp and ppGpp synthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **249**, 353-60.
- Cohn, M. & Horibata, K. (1959).** Physiology of the inhibition by glucose of the induced synthesis of β -galactosidase-enzyme system of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **78**, 624-635.
- Cole, S. T. & Raibaud, O. (1986).** The nucleotide sequence of the malT gene encoding the positive regulator of the *Escherichia coli* maltose regulon. *Gene* **42**, 201-8.
- Cooper, R. A. & Anderson, A. (1970).** The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *E. coli*. *FEBS Lett.* **11**, 273-276.
- Cossart, P. & Gicquel-Sanzey, B. (1985).** Regulation of expression of the crp gene of *Escherichia coli* K-12: in vivo study. *J Bacteriol* **161**, 454-7.
- Crasnier, M. & Danchin, A. (1990).** Characterization of *Escherichia coli* adenylate cyclase mutants with modified regulation. *J Gen Microbiol* **136**, 1825-31.
- Crasnier, M., Dumay, V. & Danchin, A. (1994).** The catalytic domain of *Escherichia coli* K-12 adenylate cyclase as revealed by deletion analysis of the cya gene. *Mol Gen Genet* **243**, 409-16.

- Crasnier-Mednansky, M., Park, M. C., Studley, W. K. & Saier, M. H. (1997).** Cra-mediated regulation of Escherichia coli adenylate cyclase. *Microbiology* **143**, 785-92.
- Curtis, S. J. & Epstein, W. (1975).** Phosphorylation of D-glucose in Escherichia coli mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *J Bacteriol* **122**, 1189-99.
- Danchin, A., Dondon, L. & Daniel, J. (1984).** Metabolic alterations mediated by 2-ketobutyrate in Escherichia coli K12. *Mol Gen Genet* **193**, 473-8.
- Daniel, J., Dondon, L. & Danchin, A. (1983).** 2-Ketobutyrate: a putative alarmone of Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **190**, 452-8.
- Daniel, J., Joseph, E. & Danchin, A. (1984).** Role of 2-ketobutyrate as an alarmone in E. coli K12: inhibition of adenylate cyclase activity mediated by the phosphoenolpyruvate: glycose phosphotransferase transport system. *Mol Gen Genet* **193**, 467-72.
- Danley, D. E., Drexler, M. & Botsford, J. L. (1977).** Differential binding of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate to the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate receptor protein in Escherichia coli. *J Bacteriol* **130**, 563-5.
- Dardonville, B. & Raibaud, O. (1990).** Characterization of malT mutants that constitutively activate the maltose regulon of Escherichia coli. *J Bacteriol* **172**, 1846-52.
- Davidson, A. L. & Nikaido, H. (1990).** Overproduction, solubilization, and reconstitution of the maltose transport system from Escherichia coli. *J Biol Chem* **265**, 4254-60.
- Davidson, A. L. & Nikaido, H. (1991).** Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from Escherichia coli. *J Biol Chem* **266**, 8946-51.
- Dean, D. A., Reizer, J., Nikaido, H. & Saier, M. H., Jr. (1990).** Regulation of the maltose transport system of Escherichia coli by the glucose-specific enzyme III of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. Characterization of inducer exclusion-resistant mutants and reconstitution of inducer exclusion in proteoliposomes. *J Biol Chem* **265**, 21005-10.
- Debarbouille, M. & Schwartz, M. (1979).** The use of gene fusions to study the expression of malT the positive regulator gene of the maltose regulon. *J Mol Biol* **132**, 521-34.

- Decker, K., Peist, R., Reidl, J., Kossmann, M., Brand, B. & Boos, W. (1993).** Maltose and maltotriose can be formed endogenously in *Escherichia coli* from glucose and glucose-1-phosphate independently of enzymes of the maltose system. *J Bacteriol* **175**, 5655-65.
- Decker, K., Plumbridge, J. & Boos, W. (1998).** Negative transcriptional regulation of a positive regulator: the expression of malT, encoding the transcriptional activator of the maltose regulon of *Escherichia coli*, is negatively controlled by Mlc. *Mol Microbiol* **27**, 381-90.
- den Blaauwen, J. L. & Postma, P. W. (1985).** Regulation of cyclic AMP synthesis by enzyme III_{Glc} of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in crp strains of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **164**, 477-8.
- Dessein, A., Tillier, F. & Ullmann, A. (1978).** Catabolite modulator factor: physiological properties and in vivo effects. *Mol Gen Genet* **162**, 89-94.
- Diederichs, K., Diez, J., Greller, G., Muller, C., Breed, J., Schnell, C., Vonrhein, C., Boos, W. & Welte, W. (2000).** Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *thermococcus litoralis* [In Process Citation]. *Embo J* **19**, 5951-61.
- Donahue, J. L., Bownas, J. L., Niehaus, W. G. & Larson, T. J. (2000).** Purification and characterization of glpX-encoded fructose 1, 6- bisphosphatase, a new enzyme of the glycerol 3-phosphate regulon of *escherichia coli* [In Process Citation]. *J Bacteriol* **182**, 5624-7.
- Dumay, V., Danchin, A. & Crasnier, M. (1996).** Regulation of *Escherichia coli* adenylate cyclase activity during hexose phosphate transport. *Microbiology* **142**, 575-83.
- Ebright, R. H., Cossart, P., Gicquel-Sanzey, B. & Beckwith, J. (1984).** Mutations that alter the DNA sequence specificity of the catabolite gene activator protein of *E. coli*. *Nature* **311**, 232-5.
- Ebright, R. H., Le Grice, S. F., Miller, J. P. & Krakow, J. S. (1985).** Analogs of cyclic AMP that elicit the biochemically defined conformational change in catabolite gene activator protein (CAP) but do not stimulate binding to DNA. *J Mol Biol* **182**, 91-107.
- Ehrmann, M. & Boos, W. (1987).** Identification of endogenous inducers of the mal regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 3539-45.

- Emmer, M., deCrombrughe, B., Pastan, I. & Perlman, R. (1970).** Cyclic AMP receptor protein of *E. coli*: its role in the synthesis of inducible enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**, 480-7.
- Emr, S. D. & Silhavy, T. J. (1980).** Mutations affecting localization of an *Escherichia coli* outer membrane protein, the bacteriophage lambda receptor. *J Mol Biol* **141**, 63-90.
- Eppler, T. (1997).** Untersuchungen zum Einfluß von Glycerin auf das Maltosesystem von *Escherichia coli*. *Diplomarbeit, Universität Konstanz*.
- Eppler, T. & Boos, W. (1999).** Glycerol-3-phosphate-mediated repression of malT in *Escherichia coli* does not require metabolism, depends on enzyme IIAGlc and is mediated by cAMP levels. *Mol Microbiol* **33**, 1221-31.
- Epps, H. M. R. & Gale, E. F. (1942).** The influence of the presence of glucose during growth on the enzymatic activities of *E. coli*: comparison of the effect with that produced by fermentation acids. *Biochem. J.* **36**, 619-623.
- Epstein, W., Rothman-Denes, L. B. & Hesse, J. (1975).** Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2300-4.
- Farr, S. B., Arnosti, D. N., Chamberlin, M. J. & Ames, B. N. (1989).** An apaH mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5010-4.
- Ferenci, T., Muir, M., Lee, K. S. & Maris, D. (1986).** Substrate specificity of the *Escherichia coli* maltodextrin transport system and its component proteins. *Biochim Biophys Acta* **860**, 44-50.
- Feucht, B. U. & Saier, M. H., Jr. (1980).** Fine control of adenylate cyclase by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **141**, 603-10.
- Fraenkel, D. G. (1996).** Glycolysis. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 189-198. Edited by F. C. Neidhardt, Curtiss, R., III, Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H. E., eds. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.

- Fraval, H. N. A. & D.C.H., M. (1980).** The effect of methyl glyoxal on cell division and the synthesis of protein and DNA in synchronous and asynchronous cultures of *E. coli*. *J Gen Microbiol* **117**, 127-134.
- Freundlieb, S., Ehmann, U. & Boos, W. (1988).** Facilitated diffusion of p-nitrophenyl-alpha-D-maltohexaoside through the outer membrane of *Escherichia coli*. Characterization of LamB as a specific and saturable channel for maltooligosaccharides. *J Biol Chem* **263**, 314-20.
- Garges, S. & Adhya, S. (1988).** Cyclic AMP-induced conformational change of cyclic AMP receptor protein (CRP): intragenic suppressors of cyclic AMP-independent CRP mutations. *J Bacteriol* **170**, 1417-22.
- Ghosaini, L. R., Brown, A. M. & Sturtevant, J. M. (1988).** Scanning calorimetric study of the thermal unfolding of catabolite activator protein from *Escherichia coli* in the absence and presence of cyclic mononucleotides. *Biochemistry* **27**, 5257-61.
- Goerlich, O., Foeckler, R. & Holler, E. (1982).** Mechanism of synthesis of adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine (AppppA) by aminoacyl-tRNA synthetases. *Eur J Biochem* **126**, 135-42.
- Goldenbaum, P. E. & Dobrogosz, W. J. (1968).** The effect of cyclic 3',5'-AMP on catabolite repression of beta-galactosidase synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **33**, 828-33.
- Gosseringer, R., Kuster, E., Galinier, A., Deutscher, J. & Hillen, W. (1997).** Cooperative and non-cooperative DNA binding modes of catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* result from sensing two different signals. *J Mol Biol* **266**, 665-76.
- Groat, R. G., Schultz, J. E., Zychlinsky, E., Bockman, A. & Matin, A. (1986).** Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J Bacteriol* **168**, 486-93.
- Gstrein-Reider, E. & Schweiger, M. (1982).** Regulation of adenylate cyclase in *E. coli*. *Embo J* **1**, 333-7.
- Guidi-Rontani, C., Danchin, A. & Ullmann, A. (1980).** Catabolite repression in *Escherichia coli* mutants lacking cyclic AMP receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 5799-801.

- Hall, M. D., Levitt, D. G. & Banaszak, L. J. (1992).** Crystal structure of Escherichia coli malate dehydrogenase. A complex of the apoenzyme and citrate at 1.87 Å resolution. *J Mol Biol* **226**, 867-82.
- Hanamura, A. & Aiba, H. (1991).** Molecular mechanism of negative autoregulation of Escherichia coli crp gene. *Nucleic Acids Res* **19**, 4413-9.
- Hanamura, A. & Aiba, H. (1992).** A new aspect of transcriptional control of the Escherichia coli crp gene: positive autoregulation. *Mol Microbiol* **6**, 2489-97.
- Harman, J. G., McKenney, K. & Peterkofsky, A. (1986).** Structure-function analysis of three cAMP-independent forms of the cAMP receptor protein. *J Biol Chem* **261**, 16332-9.
- Harwood, J. P. & Peterkofsky, A. (1975).** Glucose-sensitive adenylate cyclase in toluene-treated cells of Escherichia coli B. *J Biol Chem* **250**, 4656-62.
- Haseltine, W. A. & Block, R. (1973).** Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 1564-8.
- Hatfield, D., Hofnung, M. & Schwartz, M. (1969).** Genetic analysis of the maltose A region in Escherichia coli. *J Bacteriol* **98**, 559-67.
- Hatfield, D., Hofnung, M. & Schwartz, M. (1969).** Nonsense mutations in the maltose A region of the genetic map of Escherichia coli. *J Bacteriol* **100**, 1311-5.
- He, B. & Zalkin, H. (1994).** Regulation of Escherichia coli purA by purine repressor, one component of a dual control mechanism. *J Bacteriol* **176**, 1009-13.
- Heim, R. & Strehler, E. E. (1991).** Cloning an Escherichia coli gene encoding a protein remarkably similar to mammalian aldehyde dehydrogenases. *Gene* **99**, 15-23.
- Hengge, R. & Boos, W. (1983).** Maltose and lactose transport in Escherichia coli. Examples of two different types of concentrative transport systems. *Biochim Biophys Acta* **737**, 443-78.
- Henkin, T. M., Grundy, F. J., Nicholson, W. L. & Chambliss, G. H. (1991).** Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in Bacillus subtilis involves a trans-acting gene product homologous to the Escherichia coli lacI and galR repressors. *Mol Microbiol* **5**, 575-84.

-
- Heyde, M., Coll, J. L. & Portalier, R. (1991).** Identification of *Escherichia coli* genes whose expression increases as a function of external pH. *Mol Gen Genet* **229**, 197-205.
- Heyde, M. & Portalier, R. (1987).** Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K 12 by pH. *Mol Gen Genet* **208**, 511-7.
- Heyduk, T. & Lee, J. C. (1989).** *Escherichia coli* cAMP receptor protein: evidence for three protein conformational states with different promoter binding affinities. *Biochemistry* **28**, 6914-24.
- Higashitani, A., Higashitani, N., Yasuda, S. & Horiuchi, K. (1994).** A general and fast method for mapping mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *Nucleic Acids Res* **22**, 2426-7.
- Hofnung, M. (1974).** Divergent operons and the genetic structure of the maltose B region in *Escherichia coli* K12. *Genetics* **76**, 169-84.
- Hofnung, M., Hatfield, D. & Schwartz, M. (1974).** malB region in *Escherichia coli* K-12: characterization of new mutations. *J Bacteriol* **117**, 40-7.
- Hofnung, M. & Schwartz, M. (1971).** Mutations allowing growth on maltose of *Escherichia coli* K 12 strains with a deleted malT gene. *Mol Gen Genet* **112**, 117-32.
- Hofnung, M., Schwartz, M. & Hatfield, D. (1971).** Complementation studies in the maltose-A region of *Escherichia coli* K12 genetic map. *J. Mol. Biol.* **61**, 681-694.
- Hogema, B. M., Arents, J. C., Bader, R., Eijkemans, K., Inada, T., Aiba, H. & Postma, P. W. (1998).** Inducer exclusion by glucose 6-phosphate in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**, 755-65.
- Hogema, B. M., Arents, J. C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H. & Postma, P. W. (1998).** Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. *Mol Microbiol* **30**, 487-98.
- Hogema, B. M., Arents, J. C., Inada, T., Aiba, H., van Dam, K. & Postma, P. W. (1997).** Catabolite repression by glucose 6-phosphate, gluconate and lactose in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **24**, 857-67.

- Holland, M. M., Leib, T. K. & Gerlt, J. A. (1988).** Isolation and characterization of a small catalytic domain released from the adenylate cyclase from *Escherichia coli* by digestion with trypsin. *J Biol Chem* **263**, 14661-8.
- Hor, L. I. & Shuman, H. A. (1993).** Genetic analysis of periplasmic binding protein dependent transport in *Escherichia coli*. Each lobe of maltose-binding protein interacts with a different subunit of the MalFGK2 membrane transport complex. *J Mol Biol* **233**, 659-70.
- Hueck, C. J. & Hillen, W. (1995).** Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria? *Mol Microbiol* **15**, 395-401.
- Hueck, C. J., Hillen, W. & Saier, M. H. (1994).** Analysis of a cis-active sequence mediating catabolite repression in gram-positive bacteria. *Res Microbiol* **145**, 503-18.
- Hurley, J. H., Faber, H. R., Worthylake, D., Meadow, N. D., Roseman, S., Pettigrew, D. W. & Remington, S. J. (1993).** Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* III_{Glc} with glycerol kinase. *Science* **259**, 673-7.
- Inada, T., Takahashi, H., Mizuno, T. & Aiba, H. (1996).** Down regulation of cAMP production by cAMP receptor protein in *Escherichia coli*: an assessment of the contributions of transcriptional and posttranscriptional control of adenylate cyclase. *Mol Gen Genet* **253**, 198-204.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-8.
- Ishii, J. N., Okajima, Y. & Nakae, T. (1981).** Characterization of lamB protein from the outer membrane of *Escherichia coli* that forms diffusion pores selective for maltose-maltodextrins. *FEBS Lett* **134**, 217-20.
- Ishizuka, H., Hanamura, A., Inada, T. & Aiba, H. (1994).** Mechanism of the down-regulation of cAMP receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of the *crp* gene. *Embo J* **13**, 3077-82.
- Ishizuka, H., Hanamura, A., Kunimura, T. & Aiba, H. (1993).** A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **10**, 341-50.

- Johansson, J., Dagberg, B., Richet, E. & Uhlin, B. E. (1998).** H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**, 6117-25.
- Johnstone, D. B. & Farr, S. B. (1991).** AppppA binds to several proteins in *Escherichia coli*, including the heat shock and oxidative stress proteins DnaK, GroEL, E89, C45 and C40. *Embo J* **10**, 3897-904.
- Kanazawa, H. & Anraku, Y. (1978).** Transient repression of beta-galactosidase synthesis by glucose-6-phosphate in a mutant of *Escherichia coli* lacking enzyme II specific for glucose in the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. *J Biochem (Tokyo)* **83**, 1337-43.
- Katz, L. & Englesberg, E. (1971).** Hyperinducibility as a result of mutation in structural genes and self-catabolite repression in *ara* operon. *J Bacteriol* **107**, 34-52.
- Kellermann, O. & Szmelcman, S. (1974).** Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Involvement of a "periplasmic" maltose binding protein. *Eur J Biochem* **47**, 139-49.
- Kim, S. Y., Nam, T. W., Shin, D., Koo, B. M., Seok, Y. J. & Ryu, S. (1999).** Purification of Mlc and analysis of its effects on the *pts* expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**, 25398-402.
- Kimata, K., Inada, T., Tagami, H. & Aiba, H. (1998).** A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the *ptsG* gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **29**, 1509-19.
- Kleckner, N., Bender, J. & Gottesman, S. (1991).** Uses of transposons with emphasis on Tn10. *Methods Enzymol* **204**, 139-80.
- Klein, W. & Boos, W. (1993).** Induction of the lambda receptor is essential for effective uptake of trehalose in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 1682-6.
- Koiwai, O. & Hayashi, H. (1979).** Studies on bacterial chemotaxis. IV. Interaction of maltose receptor with a membrane-bound chemosensing component. *J Biochem (Tokyo)* **86**, 27-34.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. & Adhya, S. (1993).** Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* **62**, 749-95.

-
- Kolbus, T. (1996).** Studien zur Osmolaritätsabhängigkeit des *mal*-Regulons. *Diplomarbeit, Universität Konstanz.*
- Krakow, J. S. & Pastan, I. (1973).** Cyclic adenosine monophosphate receptor: loss of cAMP-dependent DNA binding activity after proteolysis in the presence of cyclic adenosine monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 2529-33.
- Krueger, S., Gorshkova, I., Brown, J., Hoskins, J., McKenney, K. H. & Schwarz, F. P. (1998).** Determination of the conformations of cAMP receptor protein and its T127L,S128A mutant with and without cAMP from small angle neutron scattering measurements. *J Biol Chem* **273**, 20001-6.
- Kühnau, S., Reyes, M., Sievertsen, A., Shuman, H. A. & Boos, W. (1991).** The activities of the Escherichia coli MalK protein in maltose transport, regulation, and inducer exclusion can be separated by mutations. *J Bacteriol* **173**, 2180-6.
- Kundig, W., Gosh, S. & Roseman, S. (1964).** Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **52**, 1067-1074.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Larson, T. J., Schumacher, G. & Boos, W. (1982).** Identification of the *glpT*-encoded sn-glycerol-3-phosphate permease of Escherichia coli, an oligomeric integral membrane protein. *J Bacteriol* **152**, 1008-21.
- Lee, N. & Bendet, I. (1967).** Crystalline L-ribulokinase from Escherichia coli. *J Biol Chem* **242**, 2043-50.
- Lee, S. J., Boos, W., Bouche, J. P. & Plumbridge, J. (2000).** Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, *mlc*, of Escherichia coli [In Process Citation]. *Embo J* **19**, 5353-61.
- Liao, D. I., Kapadia, G., Reddy, P., Saier, M. H., Reizer, J. & Herzberg, O. (1991).** Structure of the IIA domain of the glucose permease of Bacillus subtilis at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* **30**, 9583-94.

- Lieberman, E., Reddy, P., Gazdar, C. & Peterkofsky, A. (1985).** The Escherichia coli adenylate cyclase complex. Stimulation by potassium and phosphate. *J Biol Chem* **260**, 4075-81.
- Limon, A., Hidalgo, E. & Aguilar, J. (1997).** The aldA gene of Escherichia coli is under the control of at least three transcriptional regulators. *Microbiology* **143**, 2085-95.
- Lin, E. C. & Iuchi, S. (1991).** Regulation of gene expression in fermentative and respiratory systems in Escherichia coli and related bacteria. *Annu Rev Genet* **25**, 361-87.
- Lomovskaya, O. L., Kidwell, J. P. & Matin, A. (1994).** Characterization of the sigma 38-dependent expression of a core Escherichia coli starvation gene, pexB. *J Bacteriol* **176**, 3928-35.
- Magasanik, B. (1961).** Catabolite repression. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **26**, 249-256.
- Majors, J. (1975).** Specific binding of CAP factor to lac promoter DNA. *Nature* **256**, 672-4.
- Makman, R. S. & Sutherland, E. W. (1965).** Adenosine 3'-5'-phosphate in E. coli. *J. Biol. Chem.* **240**, 1309-1314.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- McGinnis, J. F. & Paigen, K. (1969).** Catabolite inhibition: a general phenomenon in the control of carbohydrate utilization. *J Bacteriol* **100**, 902-13.
- McKay, D. B. & Steitz, T. A. (1981).** Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* **290**, 744-9.
- Mechulam, Y., Fromant, M., Mellot, P., Plateau, P., Blanchin-Roland, S., Fayat, G. & Blanquet, S. (1985).** Molecular cloning of the Escherichia coli gene for diadenosine 5',5''-P₁,P₄-tetraphosphate pyrophosphohydrolase. *J Bacteriol* **164**, 63-9.
- Meins, M., Zanolari, B., Rosenbusch, J. P. & Erni, B. (1988).** Glucose permease of Escherichia coli. Purification of the IIGlc subunit and functional characterization of its oligomeric forms. *J Biol Chem* **263**, 12986-93.

- Meyer, D., Schneider-Fresenius, C., Horlacher, R., Peist, R. & Boos, W. (1997).** Molecular characterization of glucokinase from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **179**, 1298-306.
- Miller, C. G. (1996).** Protein degradation and proteolytic modification. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 938-954. Edited by F. C. Neidhardt, R. Curtiss, III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & H. E. Umbarger, eds. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.
- Miller, J. H. (1972).** *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, J. H. (1992).** *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mimmack, M. L., Gallagher, M. P., Pearce, S. R., Hyde, S. C., Booth, I. R. & Higgins, C. F. (1989).** Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: stoichiometry of ATP hydrolysis during transport in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8257-61.
- Monod, J. (1942).** *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*. Paris: Hermann.
- Mori, K. & Aiba, H. (1985).** Evidence for negative control of *cya* transcription by cAMP and cAMP receptor protein in intact *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* **260**, 14838-43.
- Mueller, E. J., Meyer, E., Rudolph, J., Davisson, V. J. & Stubbe, J. (1994).** N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide: evidence for a new intermediate and two new enzymatic activities in the de novo purine biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 2269-78.
- Munch-Petersen, A. & Mygind, B. (1976).** Nucleoside transport systems in *Escherichia coli* K12: specificity and regulation. *J Cell Physiol* **89**, 551-9.
- Munch-Petersen, A. & Mygind, B. (1983).** Transport of nucleic acid precursors. In *Metabolism of Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms*, pp. p. 259-305. Edited by A. e. Munch-Petersen. London: Academic Press, Inc.,.

-
- Nelson, S. O., Scholte, B. J. & Postma, P. W. (1982).** Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system-mediated regulation of carbohydrate metabolism in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **150**, 604-15.
- Nelson, S. O., Schuitema, A. R. & Postma, P. W. (1986).** The phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system of *Salmonella typhimurium*. The phosphorylated form of III₁Glc. *Eur J Biochem* **154**, 337-41.
- Nelson, S. O., Wright, J. K. & Postma, P. (1983).** The mechanism of inducer exclusion. Direct interaction between purified III₁Glc of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and the lactose carrier of *E. coli*. *Embo J* **2**, 715-720.
- Nishimura, J. S. (1986).** Succinyl-CoA synthetase structure-function relationships and other considerations. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **58**, 141-72.
- Nohno, T., Saito, T. & Hong, J. S. (1986).** Cloning and complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* glutamine permease operon (glnHPQ). *Mol Gen Genet* **205**, 260-9.
- Oh, H., Park, Y. & Park, C. (1999).** A mutated PtsG, the glucose transporter, allows uptake of D-ribose. *J Biol Chem* **274**, 14006-11.
- Okamoto, K. & Freundlich, M. (1986).** Mechanism for the autogenous control of the *crp* operon: transcriptional inhibition by a divergent RNA transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5000-4.
- Okamoto, K., Hara, S., Bhasin, R. & Freundlich, M. (1988).** Evidence in vivo for autogenous control of the cyclic AMP receptor protein gene (*crp*) in *Escherichia coli* by divergent RNA. *J Bacteriol* **170**, 5076-9.
- Olmsted, J. B. (1981).** Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. *J Biol Chem* **256**, 11955-7.
- Osumi, T. & Saier, M. H., Jr. (1982).** Mechanism of regulation of the lactose permease by the phosphotransferase system in *Escherichia coli*: evidence for protein- protein interaction. *Ann Microbiol (Paris)* **133**, 269-73.
- Osumi, T. & Saier, M. H., Jr. (1982).** Regulation of lactose permease activity by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system: evidence for direct binding of the glucose-specific enzyme III to the lactose permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 1457-61.

- Palm, D., Goerl, R. & Burger, K. J. (1985).** Evolution of catalytic and regulatory sites in phosphorylases. *Nature* **313**, 500-2.
- Palmer, T. N., Ryman, B. E. & Whelan, W. J. (1976).** The action pattern of amyloamylase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **69**, 105-15.
- Palva, E. T. & Westermann, P. (1979).** Arrangement of the maltose-inducible major outer membrane proteins, the bacteriophage lambda receptor in *Escherichia coli* and the 44 K protein in *Salmonella typhimurium*. *FEBS Lett* **99**, 77-80.
- Panagiotidis, C. H., Boos, W. & Shuman, H. A. (1998).** The ATP-binding cassette subunit of the maltose transporter MalK antagonizes MalT, the activator of the *Escherichia coli* mal regulon. *Mol Microbiol* **30**, 535-46.
- Passner, J. M. & Steitz, T. A. (1997).** The structure of a CAP-DNA complex having two cAMP molecules bound to each monomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2843-7.
- Pastan, I. & Perlman, R. (1970).** Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. *Science* **169**, 339-44.
- Peist, R. (1996).** Der Reaktionsmechanismus von MalZ, einer Cyclodextrinase aus *Escherichia coli*. *Promotionsarbeit, Universität Konstanz*.
- Peist, R., Koch, A., Bolek, P., Sewitz, S., Kolbus, T. & Boos, W. (1997).** Characterization of the aes gene of *Escherichia coli* encoding an enzyme with esterase activity. *J Bacteriol* **179**, 7679-86.
- Pellicer, M. T., Lynch, A. S., De Wulf, P., Boyd, D., Aguilar, J. & Lin, E. C. (1999).** A mutational study of the ArcA-P binding sequences in the aldA promoter of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **261**, 170-6.
- Perlman, R. L., De Crombrughe, B. & Pastan, I. (1969).** Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in *E. coli*. *Nature* **223**, 810-2.
- Peterkofsky, A. (1988).** Redistribution of phosphate pools and the regulation of *Escherichia coli* adenylate cyclase activity. *Arch Biochem Biophys* **265**, 227-33.
- Peterkofsky, A., Reizer, A., Reizer, J., Gollop, N., Zhu, P. P. & Amin, N. (1993).** Bacterial adenyl cyclases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **44**, 31-65.

- Peterkofsky, A., Svenson, I. & Amin, N. (1989).** Regulation of Escherichia coli adenylate cyclase activity by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *FEMS Microbiol Rev* **5**, 103-8.
- Plumbridge, J. (1998).** Control of the expression of the manXYZ operon in Escherichia coli: Mlc is a negative regulator of the mannose PTS. *Mol Microbiol* **27**, 369-80.
- Plumbridge, J. (1998).** Expression of ptsG, the gene for the major glucose PTS transporter in Escherichia coli, is repressed by Mlc and induced by growth on glucose. *Mol Microbiol* **29**, 1053-63.
- Plumbridge, J. (1999).** Expression of the phosphotransferase system both mediates and is mediated by Mlc regulation in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **33**, 260-73.
- Postma, P., Epstein, W., Schuitema, A. R. & Nelson, S. O. (1988).** Carbohydrate transport and metabolism in E. coli and S. typhimurium: regulation by the PEP:carbohydrate phosphotransferase system. In *Molecular basis of biomembrane transport.*, pp. 43-52. Edited by F. Palmieri & E. Quagliariello. Amsterdam: Elsevier, Science publishing.
- Postma, P. W., Epstein, W., Schuitema, A. R. & Nelson, S. O. (1984).** Interaction between III_{Glc} of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and glycerol kinase of Salmonella typhimurium. *J Bacteriol* **158**, 351-3.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. (1993).** Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 543-94.
- Potter, K., Chaloner-Larsson, G. & Yamazaki, H. (1974).** Abnormally high rate of cyclic AMP excretion from an Escherichia coli mutant deficient in cyclic AMP receptor protein. *Biochem Biophys Res Commun* **57**, 379-85.
- Power, J. (1967).** The rhamnose genetic system in E. coli K12. *Genetics* **55**, 557-568.
- Pugsley, A. P. & Dubreuil, C. (1988).** Molecular characterization of malQ, the structural gene for the Escherichia coli enzyme amyloamylase. *Mol Microbiol* **2**, 473-9.
- Raibaud, O., Debarbouille, M. & Schwartz, M. (1983).** Use of deletions created in vitro to map transcriptional regulatory signals in the malA region of Escherichia coli. *J Mol Biol* **163**, 395-408.

- Raibaud, O. & Richet, E. (1987).** Maltotriose is the inducer of the maltose regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 3059-61.
- Raibaud, O., Roa, M., Braun-Breton, C. & Schwartz, M. (1979).** Structure of the malB region in *Escherichia coli* K12. I. Genetic map of the malK-lamB operon. *Mol Gen Genet* **174**, 241-8.
- Raibaud, O., Vidal-Ingigliardi, D. & Richet, E. (1989).** A complex nucleoprotein structure involved in activation of transcription of two divergent *Escherichia coli* promoters. *J Mol Biol* **205**, 471-85.
- Ramseier, T. M., Bledig, S., Michotey, V., Feghali, R. & Saier, M. H., Jr. (1995).** The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **16**, 1157-69.
- Randall-Hazelbauer, L. & Schwartz, M. (1973).** Isolation of the bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **116**, 1436-46.
- Reams, S. G. & Clark, D. P. (1988).** Glucose repression of anaerobic genes of *E. coli* is independent of cyclic AMP. *FEMS Microbiol Lett* **56**, 231-236.
- Reddy, P. & Kamireddi, M. (1998).** Modulation of *Escherichia coli* adenylate cyclase activity by catalytic-site mutants of protein IIA(Glc) of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J Bacteriol* **180**, 732-6.
- Reddy, P., Meadow, N., Roseman, S. & Peterkofsky, A. (1985).** Reconstitution of regulatory properties of adenylate cyclase in *Escherichia coli* extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8300-4.
- Reddy, P., Peterkofsky, A. & McKenney, K. (1989).** Hyperexpression and purification of *Escherichia coli* adenylate cyclase using a vector designed for expression of lethal gene products. *Nucleic Acids Res* **17**, 10473-88.
- Reidl, J. & Boos, W. (1991).** The malX malY operon of *Escherichia coli* encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system. *J Bacteriol* **173**, 4862-76.

- Reidl, J., Romisch, K., Ehrmann, M. & Boos, W. (1989).** MalI, a novel protein involved in regulation of the maltose system of *Escherichia coli*, is highly homologous to the repressor proteins GalR, CytR, and LacI. *J Bacteriol* **171**, 4888-99.
- Ren, Y. L., Garges, S., Adhya, S. & Krakow, J. S. (1988).** Cooperative DNA binding of heterologous proteins: evidence for contact between the cyclic AMP receptor protein and RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4138-42.
- Reyes, M., Treptow, N. A. & Shuman, H. A. (1986).** Transport of p-nitrophenyl-alpha-maltoside by the maltose transport system of *Escherichia coli* and its subsequent hydrolysis by a cytoplasmic alpha-maltosidase. *J Bacteriol* **165**, 918-22.
- Richet, E. & Raibaud, O. (1989).** MalT, the regulatory protein of the *Escherichia coli* maltose system, is an ATP-dependent transcriptional activator. *Embo J* **8**, 981-7.
- Richet, E., Vidal-Ingigliardi, D. & Raibaud, O. (1991).** A new mechanism for coactivation of transcription initiation: repositioning of an activator triggered by the binding of a second activator. *Cell* **66**, 1185-95.
- Rimmele, M. & Boos, W. (1994).** Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**, 5654-64.
- Rohwer, J. M., Bader, R., Westerhoff, H. V. & Postma, P. W. (1998).** Limits to inducer exclusion: inhibition of the bacterial phosphotransferase system by glycerol kinase. *Mol Microbiol* **29**, 641-52.
- Rolfes, R. J. & Zalkin, H. (1988).** *Escherichia coli* gene purR encoding a repressor protein for purine nucleotide synthesis. Cloning, nucleotide sequence, and interaction with the purF operator. *J Biol Chem* **263**, 19653-61.
- Ronson, C. W., Nixon, B. T. & Ausubel, F. M. (1987).** Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell* **49**, 579-81.
- Rowe, J. J., Ubbink-Kok, T., Molenaar, D., Konings, W. N. & Driessen, A. J. (1994).** NarK is a nitrite-extrusion system involved in anaerobic nitrate respiration by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **12**, 579-86.
- Roy, A., Danchin, A., Joseph, E. & Ullmann, A. (1983).** Two functional domains in adenylate cyclase of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **165**, 197-202.

- Saier, M. H. & Feucht, B. U. (1975).** Coordinate regulation of adenylate cyclase and carbohydrate permeases by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **250**, 7078-80.
- Saier, M. H., Jr. (1996).** Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **138**, 97-103.
- Saier, M. H., Jr. & Ramseier, T. M. (1996).** The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J Bacteriol* **178**, 3411-7.
- Saier, M. H. & Roseman, S. (1976).** Sugar transport. The *crr* mutation: its effect on repression of enzyme synthesis. *J Biol Chem* **251**, 6598-605.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarubbi, E., Rudd, K. E., Xiao, H., Ikehara, K., Kalman, M. & Cashel, M. (1989).** Characterization of the *spoT* gene of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264**, 15074-82.
- Schinzel, R. & Palm, D. (1990).** *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase: contribution of active site residues glutamate-637 and tyrosine-538 to the phosphorolytic cleavage of alpha-glucans. *Biochemistry* **29**, 9956-62.
- Schirmer, T., Keller, T. A., Wang, Y. F. & Rosenbusch, J. P. (1995).** Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution [see comments]. *Science* **267**, 512-4.
- Schreiber, V. & Richet, E. (1999).** Self-association of the *Escherichia coli* transcription activator MalT in the presence of maltotriose and ATP. *J Biol Chem* **274**, 33220-6.
- Schreiber, V., Steegborn, C., Clausen, T., Boos, W. & Richet, E. (2000).** A new mechanism for the control of a prokaryotic transcriptional regulator: antagonistic binding of positive and negative effectors. *Mol Microbiol* **35**, 765-76.
- Schultz, J. E., Latter, G. I. & Matin, A. (1988).** Differential regulation by cyclic AMP of starvation protein synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**, 3903-9.
- Schwartz, M. (1966).** Location of the maltose A and B loci on the genetic map of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **92**, 1083-9.

Schwartz, M. (1967). Expression phénotypique et location génétique de mutations affectant le métabolisme du maltose che E. coli K12. *Ann. l'Inst. Pasteur (Paris)* **112**, 673-700.

Schwartz, M. & Hofnung, M. (1967). [Maltodextrin phosphorylase of Escherichia coli]. *Eur J Biochem* **2**, 132-45.

Shaibe, E., Metzger, E. & Halpern, Y. S. (1985). Control of utilization of L-arginine, L-ornithine, agmatine, and putrescine as nitrogen sources in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **163**, 938-42.

Sharff, A. J., Rodseth, L. E., Spurlino, J. C. & Quioco, F. A. (1992). Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry* **31**, 10657-63.

Shuman, H. A. (1987). The genetics of active transport in bacteria. *Annu Rev Genet* **21**, 155-77.

Shuman, H. A., Silhavy, T. J. & Beckwith, J. R. (1980). Labeling of proteins with beta-galactosidase by gene fusion. Identification of a cytoplasmic membrane component of the Escherichia coli maltose transport system. *J Biol Chem* **255**, 168-74.

Silhavy, T. J., Berman, M. L. & Enquist, L. W. (1984). *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Silhavy, T. J., Brickman, E., Bassford, P. J., Jr., Casadaban, M. J., Shuman, H. A., Schwartz, V., Guarente, L., Schwartz, M. & Beckwith, J. R. (1979). Structure of the malB region in Escherichia coli K12. II. Genetic map of the malE,F,G operon. *Mol Gen Genet* **174**, 249-59.

Simons, R. W., Hoopes, B. C., McClure, W. R. & Kleckner, N. (1983). Three promoters near the termini of IS10: pIN, pOUT, and pIII. *Cell* **34**, 673-82.

Soffer, R. L. (1961). Enzymatic expression of genetic units of function concerned with galactose metabolism in E. coli. *J Bacteriol* **82**, 471-478.

Spurlino, J. C., Lu, G. Y. & Quioco, F. A. (1991). The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J Biol Chem* **266**, 5202-19.

- Sridhara, S. & Wu, T. T. (1969).** Purification and properties of lactaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **244**, 5233-8.
- Szmelcman, S., Schwartz, M., Silhavy, T. J. & Boos, W. (1976).** Maltose transport in *Escherichia coli* K12. A comparison of transport kinetics in wild-type and lambda-resistant mutants as measured by fluorescence quenching. *Eur J Biochem* **65**, 13-9.
- Tagami, H., Inada, T., Kunimura, T. & Aiba, H. (1995).** Glucose lowers CRP* levels resulting in repression of the lac operon in cells lacking cAMP. *Mol Microbiol* **17**, 251-8.
- Takahashi, H., Inada, T., Postma, P. & Aiba, H. (1998).** CRP down-regulates adenylate cyclase activity by reducing the level of phosphorylated IIA(Glc), the glucose-specific phosphotransferase protein, in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **259**, 317-26.
- Takahashi, M., Blazy, B. & Baudras, A. (1980).** An equilibrium study of the cooperative binding of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate to the adenosine cyclic 3',5'-monophosphate receptor protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **19**, 5124-30.
- Tanaka, Y., Kimata, K., Inada, T., Tagami, H. & Aiba, H. (1999).** Negative regulation of the pts operon by Mlc: mechanism underlying glucose induction in *Escherichia coli*. *Genes Cells* **4**, 391-9.
- Tapio, S., Yeh, F., Shuman, H. A. & Boos, W. (1991).** The malZ gene of *Escherichia coli*, a member of the maltose regulon, encodes a maltodextrin glucosidase. *J Biol Chem* **266**, 19450-8.
- Tesfa-Selase, F. & Drabble, W. T. (1992).** Regulation of the gua operon of *Escherichia coli* by the DnaA protein. *Mol Gen Genet* **231**, 256-64.
- Tiedeman, A. A., Keyhani, J., Kamholz, J., Daum, H. A., Gots, J. S. & Smith, J. M. (1989).** Nucleotide sequence analysis of the purEK operon encoding 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole carboxylase of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **171**, 205-12.
- Treptow, N. A. & Shuman, H. A. (1985).** Genetic evidence for substrate and periplasmic-binding-protein recognition by the MalF and MalG proteins, cytoplasmic membrane components of the *Escherichia coli* maltose transport system. *J Bacteriol* **163**, 654-60.

Truniger, V., Boos, W. & Sweet, G. (1992). Molecular analysis of the glpFKX regions of *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* **174**, 6981-91.

Ullmann, A. & Monod, J. (1968). Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in *E. coli*. *FEBS Lett* **2**, 57-60.

Ullmann, A., Tillier, F. & Monod, J. (1976). Catabolite modulator factor: a possible mediator of catabolite repression in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3476-9.

van Gemen, B., Koets, H. J., Plooy, C. A., Bodlaender, J. & Van Knippenberg, P. H. (1987). Characterization of the ksgA gene of *Escherichia coli* determining kasugamycin sensitivity. *Biochimie* **69**, 841-8.

Vidal-Ingigliardi, D. & Raibaud, O. (1991). Three adjacent binding sites for cAMP receptor protein are involved in the activation of the divergent malEp-malKp promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 229-33.

Vidal-Ingigliardi, D., Richet, E., Danot, O. & Raibaud, O. (1993). A small C-terminal region of the *Escherichia coli* MalT protein contains the DNA-binding domain. *J Biol Chem* **268**, 24527-30.

Vidal-Ingigliardi, D., Richet, E. & Raibaud, O. (1991). Two MalT binding sites in direct repeat. A structural motif involved in the activation of all the promoters of the maltose regulons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **218**, 323-334.

Wang, A. & Roth, J. R. (1988). Activation of silent genes by transposons Tn5 and Tn10. *Genetics* **120**, 875-85.

Watanabe, W., Sampei, G., Aiba, A. & Mizobuchi, K. (1989). Identification and sequence analysis of *Escherichia coli* purE and purK genes encoding 5'-phosphoribosyl-5-amino-4-imidazole carboxylase for de novo purine biosynthesis. *J Bacteriol* **171**, 198-204.

Waygood, E. B. (1986). Enzyme I of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system has two sites of phosphorylation per dimer. *Biochemistry* **25**, 4085-90.

Weber, I. T. & Steitz, T. A. (1987). Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol* **198**, 311-26.

- Weickert, M. J. & Chambliss, G. H. (1990).** Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6238-42.
- Weigel, N., Kukuruzinska, M. A., Nakazawa, A., Waygood, E. B. & Roseman, S. (1982).** Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Phosphoryl transfer reactions catalyzed by enzyme I of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **257**, 14477-91.
- Weigel, N., Powers, D. A. & Roseman, S. (1982).** Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Primary structure and active site of a general phosphocarrier protein (HPr) from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **257**, 14499-509.
- Weigel, N., Waygood, E. B., Kukuruzinska, M. A., Nakazawa, A. & Roseman, S. (1982).** Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Isolation and characterization of enzyme I from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **257**, 14461-9.
- Weitzman, P. D. (1981).** Unity and diversity in some bacterial citric acid-cycle enzymes. *Adv Microb Physiol* **22**, 185-244.
- Westh Hansen, S. E., Jensen, N. & Munch-Petersen, A. (1987).** Studies on the sequence and structure of the *Escherichia coli* K-12 *nupG* gene, encoding a nucleoside-transport system. *Eur J Biochem* **168**, 385-91.
- Wiesmeyer, H. & Cohn, M. (1960).** The characterization of the pathway of maltose utilization by *Escherichia coli*. I. Purification and physical chemical properties of the enzyme amyloamylase. *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 417-426.
- Wiesmeyer, H. & Cohn, M. (1960).** The characterization of the pathway of maltose utilization by *Escherichia coli*. II. General properties and mechanism of action of amyloamylase. *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 427-439.
- Worthylake, D., Meadow, N. D., Roseman, S., Liao, D. I., Herzberg, O. & Remington, S. J. (1991).** Three-dimensional structure of the *Escherichia coli* phosphocarrier protein III_{glc}. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10382-6.
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G. & Cashel, M. (1991).** Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J Biol Chem* **266**, 5980-90.

Yang, J. K., Bloom, R. W. & Epstein, W. (1979). Catabolite and transient repression in *E. coli* do not require enzyme I of the phosphotransferase system. *J Bacteriol* **38**, 275-279.

Yang, J. K. & Epstein, W. (1983). Purification and characterization of adenylate cyclase from *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* **258**, 3750-8.

Zalkin, H. & Nygaard, P. (1996). Biosynthesis of Purine Nucleotides. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 561-579. Edited by F. C. Neidhardt, R. Curtiss, III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & H. E. Umbarger, eds. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.

Zdych, E., Peist, R., Reidl, J. & Boos, W. (1995). MalY of *Escherichia coli* is an enzyme with the activity of a beta C-S lyase (cystathionase). *J Bacteriol* **177**, 5035-9.

Zhang, Y., Conway, C., Rosato, M., Suh, Y. & Manson, M. D. (1992). Maltose chemotaxis involves residues in the N-terminal and C-terminal domains on the same face of maltose-binding protein. *J Biol Chem* **267**, 22813-20.

Zubay, G., Schwartz, D. & Beckwith, J. (1970). Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**, 104-10.

Zwaig, N., Kisler, W. S. & Lin, E. C. (1970). Glycerol kinase the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *E. coli*. *J Bacteriol* **102**, 753-759.