

**Signalerkennung und
Signaltransduktion im DctA/DcuS-
Sensor-Regulatorkomplex von
Escherichia coli.**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Philipp Aloysius Steinmetz
geboren am 24.05.1985 in Bad Ems

Mainz, September 2014

Dekan: [REDACTED]

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatter: [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2014

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	2
2.1	<i>Der C₄-Dicarbonsäure-Metabolismus in Escherichia coli.....</i>	<i>2</i>
2.2	<i>Aerobe C₄-Dicarboxylat-Transporter in Escherichia coli.....</i>	<i>3</i>
2.3	<i>Der anaerobe Transport von C₄-Dicarbonsäuren in Escherichia coli</i>	<i>4</i>
2.4	<i>Das DcuSR-Zweikomponentensystem</i>	<i>5</i>
2.5	<i>Die Domänenstruktur der Sensorhistidinkinase DcuS</i>	<i>6</i>
2.6	<i>α-helikale Transmembrandomänen und interaktionsvermittelnde Sequenzmotive</i>	<i>8</i>
2.7	<i>DctA als Kosensor von DcuS in der DctA/DcuS-Sensoreinheit</i>	<i>10</i>
2.8	<i>Ziele dieser Arbeit.....</i>	<i>10</i>
3	Material und Methoden	12
3.1	<i>Stämme und Plasmide.....</i>	<i>12</i>
3.2	<i>Kultivierung und Medien</i>	<i>27</i>
3.2.1	<i>Medien und Puffer.....</i>	<i>27</i>
3.2.2	<i>Kultivierung von E. coli</i>	<i>33</i>
3.3	<i>Molekulargenetische Methoden</i>	<i>36</i>
3.3.1	<i>Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al. 1986).....</i>	<i>36</i>
3.3.2	<i>Gerichtete Mutagenese.....</i>	<i>37</i>
3.3.3	<i>Ungerichtete Mutagenese von DctA</i>	<i>37</i>
3.3.4	<i>Konstruktion von Plasmiden.....</i>	<i>38</i>
3.3.5	<i>Das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System (Karimova et al. 1998)</i>	<i>42</i>
3.3.6	<i>GALLEX-System (Schneider & Engelman 2003)</i>	<i>43</i>
3.3.7	<i>Modifiziertes BACTH-System (Steindorf unveröffentlicht).....</i>	<i>44</i>
3.4	<i>Biochemische Methoden</i>	<i>45</i>
3.4.1	<i>Qualitative und quantitative Bestimmung der β-Galactosidase</i>	<i>45</i>
3.4.2	<i>Transportmessungen</i>	<i>47</i>
3.4.3	<i>Expressionsanalyse durch SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotting</i>	<i>49</i>
3.5	<i>In vivo Fluoreszenzmikroskopie</i>	<i>51</i>
3.6	<i>Bioinformatische Methoden.....</i>	<i>52</i>
4	Ergebnisse	54

4.1	Charakterisierung des bifunktionalen Charakters des Transporters DctA.....	54
4.1.1	Trennung von Transport und regulatorischer Funktion von DctA.....	55
4.1.1.1	Ungerichtete Mutagenese von DctA.....	55
4.1.1.2	Sequenz- und Strukturanalyse von DctA zur Identifikation von potentiellen Mutationsorten ..	56
4.1.1.3	Die Regulatorische Funktion der DctA-Varianten	59
4.1.1.4	Wachstumsexperimente der DctA-Varianten	62
4.1.1.5	Transportfunktion der DctA-Varianten	64
4.1.1.6	Expressionsanalyse der DctA-Varianten	68
4.1.1.7	Interaktion der DctA-Varianten mit DcuS	69
4.1.2	Vergleich der Substratspektren von DcuS und DctA	72
4.1.2.1	Effektorspezifität von DcuS	72
4.1.2.2	Substratspektrum von DctA	74
4.1.2.3	Auswirkung der Citrat-, Maleinat- und Nitropropionatkonzentration auf die Aufnahme von [¹⁴ C]-Succinat.....	75
4.1.3	Titration von DctA als Koregulator des DctA/DcuS-Sensorclusters	77
4.2	Die Transmembrandomänen von DcuS.....	79
4.2.1	Funktion der Transmembrandomänen TM1 und TM2.....	79
4.2.1.1	Sequenzanalyse von TM1 und TM2	79
4.2.1.2	Strukturmodelle der Transmembranhelices 1 und 2	82
4.2.1.3	Funktionsuntersuchungen zu TM1- und TM2-Varianten.....	83
4.2.1.4	Einfluss von DcuS-OFF- bzw. DcuS-ON-Varianten in Kombination mit DcuS(G190A/G194A) auf die <i>dcuB-lacZ</i> Expression	86
4.2.1.5	Einfluss einer DcuB-Defizienz auf die <i>dcuB-lacZ</i> Expression der TM2-Varianten DcuS(S186C/G190A) und (G190A/G194A)	89
4.2.1.6	Expressionsnachweis und Membranintegration der Varianten DcuS(S186C/G190A) und DcuS(G190A/G194A).....	90
4.2.2	Interaktionsstudien zu TM1 und TM2 aus DcuS.....	92
4.2.2.1	BACTH: Homodimerisierung von DcuS TM1- und TM2-Varianten.....	93
4.2.2.2	BACTH: Der Effekt von Fumarat auf die Homodimerisierung von TM1- und TM2-Varianten	95
4.2.2.3	BACTH: Heterodimerisierung von DcuS TM1- und TM2-Doppelmutanten.....	97
4.2.2.4	BACTH: Expressionskontrolle und Membranintegration	99
4.2.2.5	GALLEX: Homodimerisierung von TM1 und TM2	100
4.2.2.6	GALLEX: Expressions-, Membranintegrations- und Orientierungskontrollen der TM2-Konstrukte	104
4.2.2.7	Modifiziertes BACTH-System: Heterodimerisierung von TM1 mit TM2	107
4.3	Lokalisierung des DctA/DcuS-Sensorkomplexes sowie assoziierter Komponenten	110
4.3.1	Der Antwortregulator DcuR.....	111
4.3.1.1	Zelluläre Anreicherung von YFP-Fusionen des Antwortregulators DcuR	111

4.3.1.2	Funktionsnachweis der YFP-Fusionen des Antwortregulators DcuR	113
4.3.1.3	Wachstumskomplementation durch die DcuR-YFP-Fusionen	114
4.3.2	Lokalisierung des Transporters DauA in der Zelle	115
4.3.3	Die Bedeutung von zellulären Faktoren für die Lokalisierung der Komponenten des Sensorclusters	117
4.3.3.1	Auswirkungen der monomeren Variante YFP(A206K) sowie der Deletion des Transporters DauA auf die Distribution von DcuS-YFP in der Zelle	117
4.3.3.2	Lokalisierung der Transporter DctA-YFP und YFP(A206K)-DauA im DcuS bzw. DctA/DauA-negativen Hintergrund	118
4.3.4	Der Einfluss einer Koexpression von DcuS bzw. DctA auf die Lokalisierung von DctA-YFP, YFP-linker-YFP und YFP-DauA	120
5	Diskussion	124
5.1	<i>Signaltransduktion im DctA/DcuS-Sensorkomplex von Escherichia coli</i>	124
5.1.1	Die Struktur und der Transportmechanismus des DAACS-Transporters Glt_{ph}	124
5.1.2	Funktionsmutanten von DctA	126
5.1.3	Die Signaleingangsstelle des DctA/DcuS-Sensorkomplexes	131
5.1.4	Titration von DctA als Koregulator von DcuS	134
5.1.5	DctA als Koregulator vom DcuSR-Zweikomponentensystem	135
5.2	<i>Die Transmembrandomänen von DcuS</i>	138
5.2.1	Sequenzanalyse der Transmembranhelices von DcuS	138
5.2.2	Die Dimerisierungsschnittstelle des GpA-Dimers	139
5.2.3	Funktionsvarianten der Transmembranhelices 1 und 2 von DcuS	140
5.2.4	Interaktionsstudien der Transmembrandomänen TM1 und TM2	143
5.2.4.1	Die Auswirkung von Substitutionen in TM1 und TM2 auf die Dimerisierung von DcuS	143
5.2.4.2	Die Dimerisierung von TM1 und TM2	144
5.2.5	Interaktionsmodell von DcuS	146
5.3	<i>Der DauA/DctA/DcuS/DcuR-Komplex</i>	149
6	Literatur	153
7	Anhang	163
8	Veröffentlichungen und Präsentationen	181
9	Danksagung	182
10	Lebenslauf	183
11	Erklärung	184

1 Zusammenfassung

E. coli ist in der Lage unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen C_4 -Dicarbonsäuren zur Energiekonservierung zu nutzen. Das DcuS/DcuR-Zweikomponentensystem detektiert diese und reguliert die Gene für den C_4 -Dicarboxylat-Transport und Metabolismus. Dabei hängt die Sensitivität der Sensorkinase DcuS für C_4 -Dicarbonsäuren von der Anwesenheit des aeroben Symporters DctA oder des anaeroben Antiporters DcuB ab. Diese bifunktionalen Transporter bilden mit DcuS über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen Sensoreinheiten.

In dieser Arbeit wurden die Funktionen von DctA und DcuS im DctA/DcuS-Sensorkomplex analysiert. Mit DctA(S380D) wurde eine Variante des Transporters identifiziert, in der die regulatorische Eigenschaft von der katalytischen Funktion entkoppelt ist. Stämme von *E. coli*, die den DctA(S380D)/DcuS-Sensorkomplex enthielten, waren in der Lage C_4 -Dicarbonsäuren wahrzunehmen, obwohl die Transportfunktion von DctA inaktiviert war. Zudem wurden Unterschiede in den Substratspektren von DctA und DcuS festgestellt. Citrat, ein guter Effektor des DctA/DcuS-Sensorkomplexes, wurde durch DctA nicht gebunden oder transportiert. Anhand von Titrationsexperimenten mit variierenden DctA-Mengen wurde außerdem nachgewiesen, dass die Sensitivität von DcuS für seine Effektoren von der DctA-Konzentration abhängig ist. Es konnte gezeigt werden, dass DctA im DctA/DcuS-Sensorkomplex nicht an der Erkennung von C_4 -Dicarbonsäuren beteiligt ist. DcuS stellt die Signaleingangsstelle des Komplexes dar, während DctA durch seine Anwesenheit die Sensorkinase in eine funktionsbereite oder sensitive Form überführt, die auf Effektoren reagieren kann.

Darüber hinaus wurde die Rolle der Transmembranhelices TM1 und TM2 von DcuS für die Funktion und Dimerisierung der Sensorkinase untersucht. Durch Sequenzanalysen wurden „SmallxxxSmall“-Motive, deren Relevanz als Dimerisierungsschnittstellen bereits in Transmembranhelices anderer Proteine nachgewiesen wurde, in TM1 sowie TM2 identifiziert. Die Homodimerisierung beider Transmembrandomänen wurde im GALLEX Two-Hybrid System nachgewiesen, wobei die TM2-TM2-Interaktion stärker war. Die Substitution G190A/G194A im SxxxGxxxG-Tandemmotiv von TM2 rief zudem einen deutlichen Funktionsverlust der Sensorkinase hervor. Dieser Aktivitätsverlust korrelierte mit Störungen der Homodimerisierung von TM2(G190A/G194A) sowie DcuS(G190A/G194A) bei bakteriellen Two-Hybrid Messungen im GALLEX- bzw. BACTH-System. Demzufolge agiert Transmembranhelix 2 mit seinem SxxxGxxxG-Sequenzmotiv als wesentliche Homodimerisierungsstelle in DcuS. Die Dimerisierung von DcuS ist essentiell für die Funktion der Histidinkinase.

Zusätzlich wurde bei fluoreszenzmikroskopischen Studien durch Koexpression von DcuS bzw. DctA die zelluläre Kolokalisierung von DctA und DcuR mit DcuS sowie DauA mit DctA nachgewiesen. Die DctA/DcuS-Sensoreinheit kann demnach zum DauA/DctA/DcuS/DcuR-Komplex erweitert werden.

2 Einleitung

2.1 Der C₄-Dicarbonsäure-Metabolismus in *Escherichia coli*

Das fakultativ anaerobe γ -Proteobakterium *Escherichia coli* ist in der Lage unter ständig wechselnden Umweltbedingungen zu leben. Diese Anpassungsfähigkeit kann vor allem auf das große Spektrum an Substanzen, die als Kohlenstoff- und Energiequellen in einer Vielzahl von Stoffwechselwegen genutzt werden können, zurückgeführt werden. So dienen *E. coli* neben der bevorzugten Glucose auch C₄-Dicarbonsäuren sowie die C₄-Dicarboxylat-Aminosäure L-Aspartat als Wachstumssubstrate (Unden & Kleefeld 2004). Unter aeroben Bedingungen können diese vollständig im Tricarbonsäurezyklus zu Kohlenstoffdioxid oxidiert werden. Die dabei gebildeten Redoxäquivalente in Form von Ubichinol und NADH werden anschließend in der Atmungskette mit molekularem Sauerstoff reoxidiert. Der dadurch entstehende Protonengradient über der Membran wird von der ATP-Synthase zur Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat genutzt (Maloney et al. 1974). Die Aufnahme der C₄-Dicarboxylate und Aspartat erfolgt durch den Symporter DctA (Kay & Kornberg 1969; Janausch et al. 2002a), welcher jedoch bei pH 5 vom Transporter DauA abgelöst wird (Karinou et al. 2013).

In Abwesenheit von Sauerstoff hingegen werden C₄-Dicarbonsäuren als Elektronenakzeptoren in der Fumaratatmung reduziert. Dabei benötigt *E. coli* zusätzlich eine Kohlenstoff- und Energiequelle wie Glycerin zum Wachstum (Guest 1979). Succinat kann aufgrund der Unterbrechung des Tricarbonsäurezykluses unter anaeroben Bedingungen nicht weiter verstoffwechselt werden und wird deshalb im Antiport mit Fumarat durch DcuB aus der Zelle transportiert (Unden & Kleefeld 2004; Engel et al. 1994). Fumarat kann direkt durch die Fumaratreduktase FrdABC zu Succinat reduziert werden, wohingegen die Substrate L-Malat, D-Tartrat und L-Aspartat erst einmal in Fumarat umgewandelt werden müssen. Die Enzyme Fumarase B (FumB) und L-Aspartase katalysieren die Dehydratation von L-Malat zu Fumarat bzw. die Desaminierung von L-Aspartat zu Fumarat (Unden & Kleefeld 2004; Guest et al. 1984). D-Tartrat stellt ebenfalls ein Substrat von FumB dar und wird über Oxalacetat und L-Malat zu Fumarat umgesetzt (Kim et al. 2007). Bei der Fumaratatmung wird der Protonengradient durch Dehydrogenasen wie NADH-Dehydrogenase 1 und Hydrogenase 2 generiert. Die Fumaratreduktase selbst trägt nicht zum Protonengradienten der Membran bei.

2.2 Aerobe C₄-Dicarboxylat-Transporter in *Escherichia coli*

Unter aeroben Bedingungen sowie neutralem pH katalysiert der sekundäre Transporter DctA (dicarboxylate transporter A) die Aufnahme von C₄-Dicarbonsäuren (Kay & Kornberg 1969; Gutowski & Rosenberg 1975). Der K_m-Wert für den Transport von C₄-Dicarboxylaten durch DctA beträgt 30-50 µM und verläuft im Symport mit zwei Protonen (Janausch et al. 2002a; Kay & Kornberg 1971; Gutowski & Rosenberg 1975). Die C₄-Dicarbonsäuren Succinat und L-Malat sowie die Aminosäure L-Aspartat sind in der Lage die Aufnahme von Fumarat kompetitiv zu inhibieren. Wohingegen die Substanzen Oxalacetat, Glutamat, Oxoglutarat, Asparagin, Laktat, Pyruvat und Acetat keinen Einfluss auf die Fumarataufnahme besitzen (Kay & Kornberg 1969; Davis et al. 1999). DctA weist acht Transmembranhelices (TM1-8) sowie zwei Haarnadelschleifen (HP1-2) auf und gehört zur DAACS-Transporterfamilie (dicarboxylate amino acid:cation symporter) (Witan et al. 2012a).

Die Transkriptionskontrolle von *dctA* erfolgt auf mehreren Ebenen. Unter anaeroben Bedingungen wird die Transkription von *dctA* durch das Zweikomponentensystem ArcBA (anoxic redox control sensor/regulator) reprimiert (Davies et al. 1999). In Abwesenheit von Glucose hingegen steigert CRP-cAMP (cyclic adenosine monophosphate receptor protein) die *dctA*-Expression. Zudem unterliegt die Transkription des Symporters der Kontrolle des DcuS/DcuR-Zweikomponentensystems (dicarboxylate uptake sensor/regulator) und wird in Gegenwart von C₄-Dicarbonsäuren und Citrat zusätzlich induziert. Der aerobe Succinattransporter DauA (dicarboxylic acid uptake system A) beeinflusst ebenfalls die Expression von *dctA*. Eine Deletion von *dauA* wirkt sich negativ auf die Transkription von *dctA* aus (Karinou et al. 2013). Demnach ist die Synthese von DctA in der stationären Phase des aeroben Wachstums auf C₄-Dicarbonsäuren und in Gegenwart von DauA maximal. Darüber hinaus kommt es in Deletionsmutanten von *dctA* zur konstitutiven Expression des Transporters, die vom DcuSR-System abhängig ist (Davis et al. 1999; Witan et al. 2012a). Folglich reguliert DctA seine eigene Expression und deshalb wird für DctA die zusätzliche Funktion als Kosensor des DcuSR-Zweikomponentensystems angenommen. Demzufolge bildet DctA mit DcuS die DctA/DcuS-Sensoreinheit, die über eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen der cytoplasmatischen Helix 8b von DctA und der cytoplasmatischen Per-Arnt-Sim-Domäne (PAS_C) von DcuS gebildet wird (Witan et al. 2012a).

DctA wird bei pH 5 von DauA als Transporter für C₄-Dicarbonsäuren ersetzt (Karinou et al. 2013). DauA gehört zur Familie SLC26/SulP-Transporter (solute carrier/sulphate transporter) und ist in der Lage Fumarat, Succinat und Aspartat in der einfach protonierten sowie der deprotonierten Form zu transportieren. Transportmessungen mit Succinat weisen jedoch daraufhin, dass die Affinität und die Transportrate von DauA im Vergleich zu DctA niedriger sind. Computergestützten Topologiestudien zufolge besitzt dieser Transporter 12 Transmembranhelices und eine C-terminale STAS (sulphate transporter antagonist of anti-sigma factor)-Domäne. Im Gegensatz zu DctA ist die Transkription von DauA unabhängig vom DcuSR-System. Das Expressionsniveau von DauA bleibt in wildtypischen und *dcuS*-Deletionsmutanten unverändert. Zudem kann das Wachstum auf Succinat in *dcuS*-Deletionsmutanten beobachtet werden. Die Deletion von DauA wiederum schwächt die Expression von DctA. Als möglicher Regulationsmechanismus wird eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen den beiden Transportern diskutiert (Karinou et al. 2013).

2.3 Der anaerobe Transport von C₄-Dicarbonsäuren in *Escherichia coli*

In Abwesenheit von Sauerstoff sind vor allem die Transporter DcuA, DcuB und DcuC (dicarboxylate uptake transporter) am Transport von C₄-Dicarboxylaten beteiligt, wobei DcuB als Haupttransporter fungiert (Engel et al. 1994; Zientz et al. 1996). DcuB katalysiert die Aufnahme von Fumarat, Aspartat sowie L-Malat im Antiport mit Succinat. Der K_m-Wert für den Transport von Fumarat durch DcuB beträgt 100 µM. Gemäß Topologiestudien besitzt DcuB 12 Transmembrandomänen (TM1-12) und sowohl N- als auch C-Terminus des Transporters liegen im Periplasma (Bauer et al. 2011). Die Expression von *dcuB* wird unter anaeroben Bedingungen durch den Transkriptionsregulator FNR (fumarate and nitrate reduction regulatory protein) sowie in Abwesenheit von Glucose durch CRP-cAMP induziert (Golby et al. 1998). Zusätzlich erfolgt eine Steigerung der Transkription in Gegenwart von C₄-Dicarbonsäuren durch das DcuSR-System (Zientz et al. 1998; Golby et al. 1999). Das NarXL-Zweikomponentensystem (nitrate nitrite sensor/regulator) hingegen reprimiert die Expression des Transporters in Anwesenheit von Nitrat (Golby et al. 1998). Analog zu dem aeroben Transporter DctA interagiert DcuB ebenfalls mit der Sensor kinase DcuS und beeinflusst als Kosensor des DcuSR-Systems seine eigene Expression (Kleefeld et al. 2009). Deshalb kommt es in DcuB-defekten Stämmen ebenfalls zur konstitutiven Transkription von

dcuB. Die regulatorische und katalytische Funktion von DcuB konnten durch Punktmutationen entkoppelt werden. Es wurden sowohl monofunktionale Transportvarianten als auch Regulationsvarianten von DcuB identifiziert.

Der DcuB-homologe Transporter DcuA andererseits wird konstitutiv exprimiert und ist in der Lage eine Deletion von *dcuB* beim anaeroben Wachstum auf C₄-Dicarboxylaten zu kompensieren (Six et al. 1994). Unter aeroben Bedingungen ermöglicht DcuA jedoch kein substantielles Wachstum auf Succinat (Davies et al. 1999; Janausch et al. 2001), weshalb eine posttranslationale Inaktivierung des Transporters durch Sauerstoff diskutiert wird (Engel et al. 1992). DcuC wird aufgrund der Regulation durch FNR und ArcBA nur unter anaeroben Bedingungen gebildet und katalysiert vermutlich den Export von Succinat bei der Fermentation von Glucose (Zientz et al. 1999). Eine Deletionsmutante, bei der die Gene von *dcuA*, *dcuB* und *dcuC* ausgeschaltet sind, hat unter anaeroben Bedingungen einen vollkommenen Wachstumsverlust auf C₄-Dicarbonsäuren zur Folge (Zientz et al. 1996).

Zudem katalysieren die Antiporter TdtT und CitT den Export von Succinat im Gegentausch mit Tartrat bei der Tartratfermentation (Kim et al. 2007) bzw. Citrat bei der Citratfermentation (Pos et al. 1998).

2.4 Das DcuSR-Zweikomponentensystem

Damit sich Bakterien an die stets wechselnden Umweltbedingungen anpassen können, benötigen sie Regulationssysteme, die Umweltreize aufnehmen um anschließend für eine adäquate Zellantwort sorgen zu können. Zweikomponentensysteme stellen typische Signaltransduktionssysteme in Bakterien dar (West & Stock 2001; Mascher et al. 2006). Sie bestehen aus einer Sensorhistidinkinase und einem Antwortregulator. Das DcuSR-Zweikomponentensystem erkennt C₄-Dicarbonsäuren und reguliert die Expression der Gene für den C₄-Dicarboxylat-Transport sowie Metabolismus (Zientz et al. 1998; Golby et al. 1999).

Die Sensorkinase DcuS liegt als Dimer bzw. Oligomer an den Zellpolen von *E. coli* vor (Scheu et al. 2008; Scheu et al. 2010a) und detektiert seine Effektoren durch die periplasmatische PAS-Domäne (PAS_p) (Golby et al. 1999; Pappalardo et al. 2003; Kneuper et al. 2005; Cheung & Hendrickson 2008). Das Signal wird anhand der Transmembranhelix 2 (TM2) über die Membran zur cytoplasmatischen PAS_c-Domäne weitergeleitet (Scheu et al. 2010b). Dabei

wird von einem Kolbenhubmechanismus von TM2 ausgegangen. PAS_C übermitteln das Signal anschließend an die Kinasedomäne (Etzkorn et al. 2008; Monzel et al. 2013). Daraufhin wird der konservierte Histidinrest H349 des benachbarten Dimerpartners transautophosphoryliert. Die Phosphatgruppe wird im Anschluss auf den konservierten Aspartatrest D56 des Antwortregulators DcuR übertragen (Janausch et al. 2002b). In Gegenwart von Sauerstoff schaltet phosphoryliertes DcuR die Expression des C_4 -Dicarboxylat-Symporters *dctA* an (Abo-Amer et al. 2004). Unter anaeroben Bedingungen werden die Gene der Fumaratreduktase *frdABCD*, der Fumarase B *fumB* sowie des C_4 -Dicarboxylat-Antiporters *dcuB* induziert (Zientz et al. 1998).

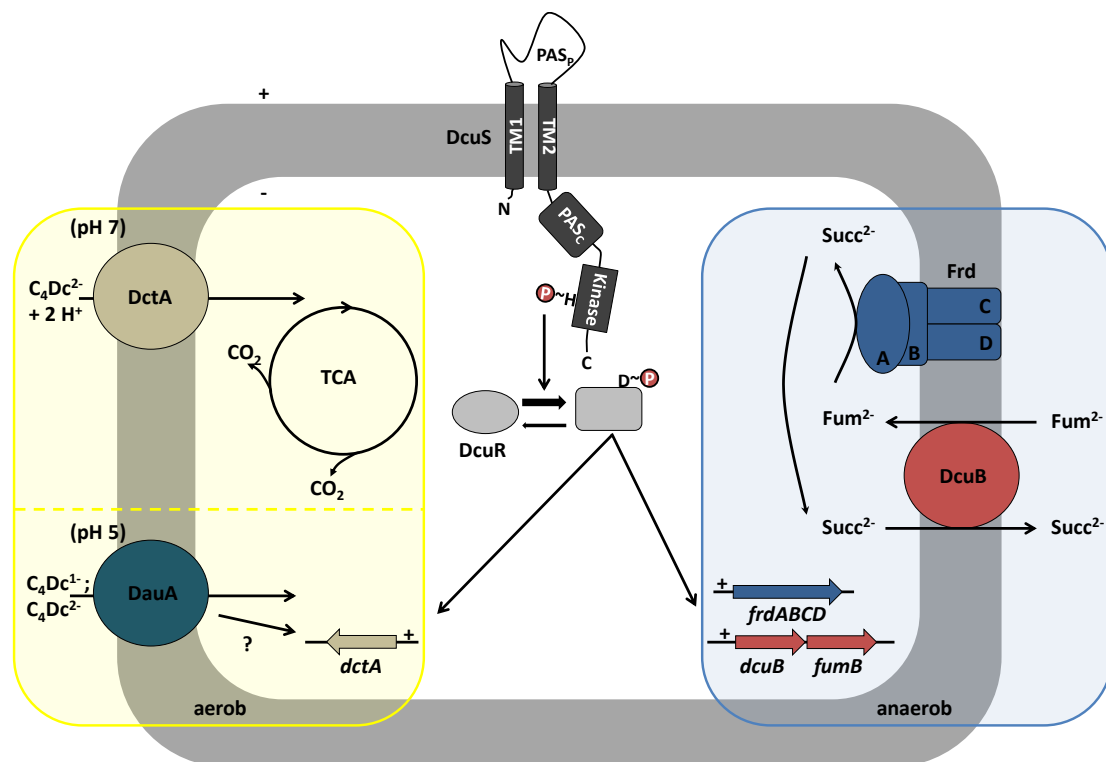


Abb. 1: Detektion, Transport und Metabolismus von C_4 -Dicarbonsäuren in *Escherichia coli*.

C_4Dc^{2-} : deprotonierte C_4 -Dicarbonsäuren; C_4Dc^{1-} : einfach protonierte C_4 -Dicarbonsäuren; TCA: Tricarbonsäurezyklus; Fum^{2-} : Fumarat²⁻; $Succ^{2-}$: Succinat²⁻

2.5 Die Domänenstruktur der Sensorhistidinkinase DcuS

Die Sensorkinase DcuS gehört zur Familie der CitA-Histidinkinasen. Diese Sensorkinasen setzen sich aus einer N-terminalen PAS-Struktur, die von zwei Transmembranhelices (TM 1 und TM2) flankiert ist, sowie einer cytoplasmatischen PAS- und Kinasedomäne zusammen. Die einzelnen Domänen von DcuS wurden mit Ausnahme der Transmembrandomänen 1 und 2 bereits charakterisiert. Die periplasmatische PAS-Domäne fungiert demnach als

Sensordomäne und besitzt Ähnlichkeit zur Per-Arnt-Sim-Domäne des photoaktiven gelben Proteins aus *Halorhodospira halophila* (Pappalardo et al. 2003). Gemäß funktioneller sowie struktureller Studien sind die Aminosäurereste R107, H110, F120, K121, G140, F141, R147 und F149 für die Effektorbindung in PAS_p von DcuS verantwortlich (Pappalardo et al. 2003; Kneuper et al. 2005; Cheung & Hendrickson 2008). Die cytoplasmatische PAS-Domäne weist im Vergleich mit PAS_p eine modifizierte Anordnung der Sekundärstrukturelemente auf und ähnelt daher eher der PAS-Domäne von NifL aus *Azotobacter vinelandii* (Etzkorn et al. 2008). PAS_c reguliert die Aktivität der Histidinkinase, indem sie in Abwesenheit von Effektoren die Kinase ruhigstellt bzw. nach Effektorbindung in PAS_p diese aktiviert (Degreif-Dünnwald 2011; Monzel et al. 2013) Zudem ermöglicht PAS_c die Interaktion mit der Helix 8b des Kosensors DctA (Witan et al. 2012a). Die Kinase von DcuS besitzt Sequenzhomologien zu den entsprechenden Domänen von EnvZ aus *E. coli* sowie einer cytoplasmatischen Kinasedomäne aus *Thermotoga maritima* (Scheu et al. 2010b). Aufgrund der Sequenzkonservierung wird für den DcuS-Dimer eine ähnliche Vier-Helix-Bündel-Struktur aus zwei Helix-Turn-Helix-Untereinheiten der DcuS-Monomere angenommen.

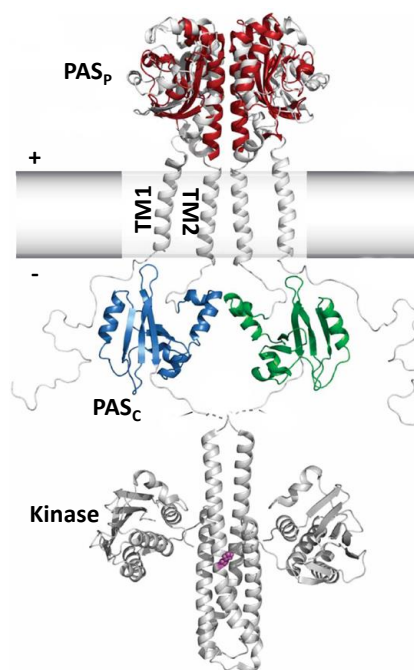


Abb. 2: Strukturmodell des DcuS-Dimers. Die NMR-Strukturen der PAS_p-Domäne von DcuS (weiß) (Pappalardo et al. 2003; PDB ID: 1OJG) wurden anhand der Kristallstruktur des PAS_p-Dimers von CitA (rot) (Sevvana et al. 2008; PDB ID: 2J80) angeordnet. Zusätzlich wurden TM1 und TM2, deren Strukturen unbekannt sind, auf Grundlage dieser CitA-Struktur modelliert. Die NMR-Strukturen der cytoplasmatischen PAS_c-Domäne (blau und grün) (Etzkorn et al. 2008; PDB ID: 2WON) liegen in der aktivierten Form vor. Ergänzend wurde die Kinasedomäne einer cytoplasmatischen Histidinkinase aus *Thermotoga maritima* (Marina et al. 2005; PDB ID: 2C2A), zu der die Kinase von DcuS Sequenzhomologie besitzt, angehängt. (geändert nach Etzkorn et al. 2008)

Je nach Transmembrandomänenvorhersage sind TM1 und TM2 von DcuS 20-21 Aminosäuren lang und beinhalten Aminosäurereste 20-41 bzw. 181-202 der Sensorkinase. Über weitere Eigenschaften sowie mögliche Funktionen beider Transmembrandomänen wurde bisher nur spekuliert. Aufgrund der Lage von TM2 zwischen PAS_P und PAS_C wird eine Beteiligung von TM2 beim Signaltransfer vom Periplasma zum Cytoplasma diskutiert. Analog zur homologen Histidinkinase CitA aus *Klebsiella pneumoniae* wird für TM2 von DcuS ebenfalls eine vektorielle Verschiebung nach Bindung von Effektoren in PAS_P vorgeschlagen (Sevvana et al. 2008; Scheu et al. 2010b).

2.6 α -helikale Transmembrandomänen und interaktionsvermittelnde Sequenzmotive

Genomanalysen weisen darauf hin, dass bis zu einem Drittel aller proteinkodierenden Gene eines Organismus Gene für membranintegrale Proteine sind (Liu & Rost 2001; Wallin & Heijne 1998). Neben ihrem Beitrag in der Signalerkennung und dem Transport von Ionen und Substraten, spielen Membranproteine (MPs) entscheidende Rollen in biologischen Prozessen wie Stoffwechselaktivität, Zell-Zell-Kommunikation, Zellverbindung sowie Stabilisierung von Zytoskelettstrukturen. Membranproteine lassen sich in drei Klassen unterteilen. (I) Monotopische Membranproteine sind an die Membran angelagert, durchdringen diese im Gegensatz zu (II) β -Faltblatt- und (III) α -helikalen Transmembranproteinen jedoch nicht. Membranintegrale Proteine der Klasse II kommen ausschließlich in der äußeren Membran von Mitochondrien, Chloroplasten und gramnegativen Bakterien vor und bilden dort aus β -Faltblattstrukturen große fassähnliche Poren (Tamm et al. 2004). Die Klasse III Transmembranproteine hingegen durchdringen die Lipiddoppelschicht anhand von α -helikalen Transmembrandomänen, die zwischen 14 – 36 Aminosäurereste umfassen (Bowie 1997). Gemäß Strukturanalysen von Membranproteinen besitzt die durchschnittliche Transmembranhelix mehr als 25 Aminosäuren (Bowie 1997) und besteht zum Großteil (34 %) aus den hydrophoben Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Leucin und Valin (Ulmschneider & Samson 2001). Dabei zeigen die β -verzweigten Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin eine gleichmäßige Verteilung in den TMs, während die Alaninreste eine eher zentrale Lage in der Helix bevorzugen. Aromatische und geladene Aminosäurereste treten hingegen vermehrt an den Enden der TMS an der Lipid-Wasser-Grenzfläche auf.

Transmembranhelices von Multidomänen-Membranproteinen stellen jedoch mehr als nur bloße Membrananker dar. Sie initiieren TM-TM-Wechselwirkungen, die für korrekte Faltung und die Funktion der MPs essentiell sind, oder sind am Signaltransfer beteiligt (Langosch & Arkin 2009; Li et al. 2012; Cymer et al. 2012). Untersuchungen zur Dimerisierung von Transmembrandomänen haben spezifische Sequenzmotive offenbart, die diese Interaktionen ermöglichen können.

GxxxG-artige bzw. SmallxxxSmall-Sequenzmotive zeichnen sich durch zwei Aminosäurereste mit kleiner Seitenkette wie Glycin, Alanin oder Serin aus, die durch drei weitere Aminosäuren getrennt sind. Diese Sequenzmotive sind in TMs überrepräsentiert (Senes et al. 2000), sie treten aber ebenfalls häufig in α -Helices von löslichen Proteinen auf (Kleiger et al. 2002). Die Positionierung der Aminosäuren mit kleinen Seitengruppen auf einer Helixseite formt flache Oberflächen, an die sich eine weitere Helix anlagern kann. Die GxxxG-Sequenzmotive stellen folglich einen Rahmen für Helix-Helix-Dimerisierung zu Verfügung (Russ & Engelman 2000). Die enge Anlagerung der Transmembrandomänen nach dem „ridge-into-groove“ (Walther et al. 1996) bzw. „knob-into-hole“ Modell (Langosch & Heringa 1998) ermöglicht zudem weitere Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte entlang der Berührungsfläche des TM-Dimers. Am GxxxG-Sequenzmotiv von humanen Glycophorin A (GpA) konnte durch ausführliche Mutagenesestudien sowie Strukturanalysen die Bedeutung dieses Sequenzmotivs für die Homodimerisierung von GpA gezeigt werden (Lemmon et al. 1992a; Lemmon & Engelman 1992; MacKenzie et al. 1997; Smith et al. 2001). Zudem können polare Aminosäuren bzw. polare Sequenzmotive die Interaktion zwischen TMs fördern. So wurde das interaktionsvermittelnde QxxS-Motiv in TM1 von dem Aspartatchemotaxis-Rezeptor Tar identifiziert (Sal-Man et al. 2004) und die polaren Aminosäurereste Q und N führten zur Dimerisierung von synthetischen Transmembrandomänen (Zhou et al. 2001; Gratkowski et al. 2001). Als ein weiteres Dimerisierungsmotiv für Transmembrandomänen dient beim Erythropoetin-Rezeptor der Maus ein Leucinzipper-ähnliches Heptad-Motiv (Gurezka et al. 1999).

2.7 DctA als Kosensor von DcuS in der DctA/DcuS-Sensoreinheit

Nach dem Modell von Witan et al. (2012a) fungiert der aerobe Symporter DctA als Kosensor des DcuSR-Zweikomponentensystems. DctA und DcuS bilden durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion eine Sensoreinheit. In Abwesenheit von C_4 -Dicarboxylaten ist DctA katalytisch inaktiv und inhibiert die Autophosphorylierung von DcuS (Abb. 3A). In Gegenwart von C_4 -Dicarbonsäuren wird der hemmende Effekt jedoch aufgehoben und die Kinaseaktivität von DcuS kann durch Bindung von Effektoren an PAS_p stimuliert werden (Abb. 3B). Der anschließende Phosphattransfer auf DcuR resultiert in der Induktion von *dctA*. DcuS verarbeitet demnach zwei Signaleingänge in der DctA/DcuS-Sensoreinheit: einerseits die Bindung von C_4 -Dicarbonsäuren in PAS_p von DcuS und andererseits den Aktivitätszustand von DctA, der durch die cytoplasmatische Helix 8b von DctA auf PAS_c von DcuS übermittelt wird. Demzufolge agiert DctA als metabolischer Fluxsensor des C_4 -Dicarbonsäure-Stoffwechsels.

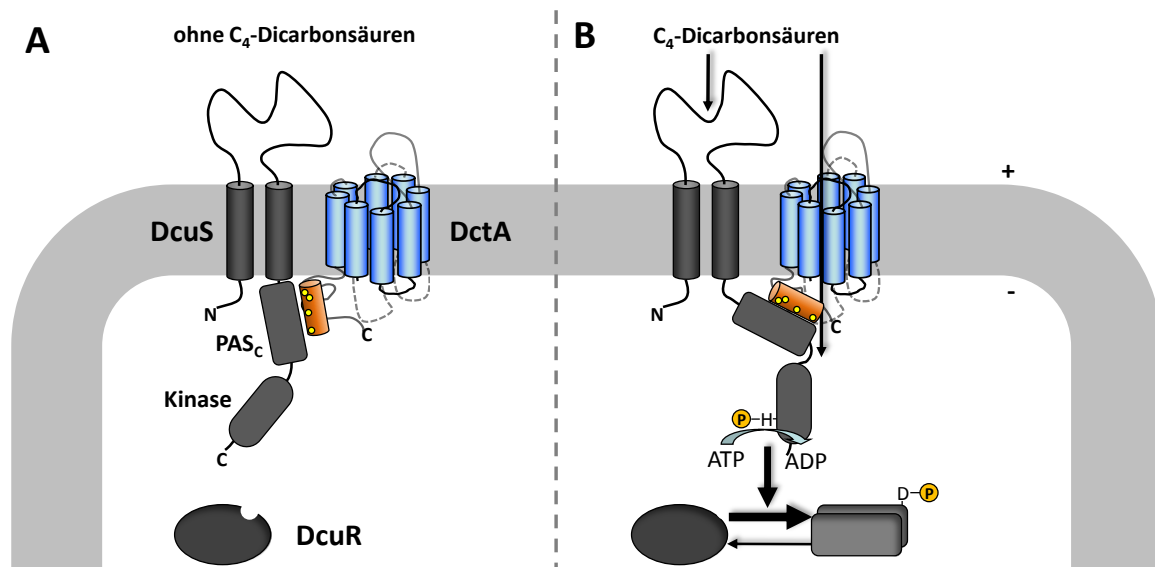


Abb. 3: Modell von DctA als Kosensor im DctA/DcuS-Sensorkomplex. (A) In Abwesenheit von C_4 -Dicarbonsäuren ist DctA transportinaktiv und inhibiert die Aktivität der Sensorkinase DcuS. (B) Durch den Transport von C_4 -Dicarbonsäuren von DctA kommt es zu einer Konformationsänderung des Transporters und der inhibitorische Effekt auf DcuS wird aufgehoben. Die gleichzeitige Bindung von Effektoren in PAS_p hat dann die Autophosphorylierung der Sensorkinase DcuS zur Folge. Nach anschließendem Phosphorylgruppentransfer auf DcuR, agiert dieses als Transkriptionsfaktor. (geändert nach Witan et al. 2012a)

2.8 Ziele dieser Arbeit

Der aerobe Transporter DctA aus *E. coli* ist ein bifunktionales Protein. Zusätzlich zur Transportfunktion von C_4 -Dicarbonsäuren (Kay & Kornberg 1969) wirkt er regulatorisch auf das DcuSR-Zweikomponentensystem und beeinflusst dadurch seine eigene Expression

(Davies et al. 1999; Witan et al. 2012a). In dieser Arbeit sollte die Rolle von DctA als Kosensor von DcuS genauer charakterisiert werden, um die Signaltransduktion im DctA/DcuS-Sensorkomplex besser zu verstehen. Zunächst sollte geklärt werden, ob DctA im DctA/DcuS-Sensorkomplex eine sensorische Funktion besitzt und als Kosensor die Anwesenheit von C₄-Dicarboxylaten erkennt oder deren Transport durchführen muss. Dazu sollten Varianten von DctA mit Transportdefekt identifiziert werden, die aber ihre regulatorische Eigenschaft noch besitzen. Dies sollte aufzeigen, ob katalytische und regulatorische Funktion des Transporters gekoppelt sind oder wie beim anaeroben Antiporter DcuB unabhängig voneinander agieren (Kleefeld et al. 2009). Die Kopplung beider Eigenschaften ist die Voraussetzung für die im Arbeitsmodell von Witan et al. (2012a) beschriebene Funktion von DctA als metabolischer Fluxsensor. Zudem sollten durch den Vergleich der Substratspektren von DctA und DcuS geprüft werden, ob es Substrate gibt, die nur DctA oder nur DcuS ansprechen. Mit solchen Substraten, die zwischen DcuS und DctA differenzieren, sollte getestet werden, ob DcuS, DctA oder beide Proteine zusammen das Reizmolekül zur Induktion der Zielgene erkennen müssen. Dadurch sollte ein besseres Verständnis der Signaleingangsstellen für C₄-Dicarbonsäuren im Sensorkomplex erhalten werden. Die Effektorspezifität von DcuS wurde anhand von *dcuB-lacZ* Expressionsmessungen und die Transportsubstrate von DctA durch Kompetitionsstudien bestimmt.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollten die TM2/TM2- und TM1/TM1-Homodimerisierungen und ihre Bedeutung für die Funktion von DcuS untersucht werden. Anhand von Sequenzanalysen sollten vielversprechende Aminosäurepositionen bzw. Sequenzmotive der TMs bestimmt werden und durch gerichtete Mutagenese substituiert werden. Diese DcuS-TM-Varianten wurden in *dcuB-lacZ* Funktionsmessungen sowie in Interaktionsstudien im BACTH- und GALLEX-System charakterisiert.

3 Material und Methoden

3.1 Stämme und Plasmide

Die Stämme und Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle M1 und M2 aufgeführt.

Tab. M1: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
AN387	F ⁻ <i>rpsL</i> , <i>gal</i>	Wallace & Young (1977)
BTH101	F ⁻ <i>cyd-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galk16</i> , <i>rpsL1</i> (<i>Strr</i>), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	Karimova et al. (2005)
BW25113	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-3</i>), λ ⁻ , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Baba et al. (2006)
C43(DE3)	F ⁺ , <i>hsdS</i> , <i>gal1</i> , DE3; Spontanmutation von BL21(DE3)	Miroux & Walker (1996)
EK1	BW25113, aber Δ <i>dauA</i>	Karinou et al. (2013)
EK3	BW25113, aber Δ <i>dauA</i> / Δ <i>dctA</i>	Karinou et al. (2013)
IMW237	MC4100, aber λ [Φ (<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i>) <i>hyb</i> , <i>bla</i> ⁺]	Zientz et al. (1998)
IMW238	MC4100, aber λ [Φ (<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i>) <i>hyb</i> <i>bla</i> ⁺], aber <i>dcuR</i> :: <i>kan</i> ^R	Zientz et al. (1998)
IMW260	MC4100, aber λ [Φ (<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i>) <i>hyb</i> , <i>bla</i> ⁺], aber <i>dcuS</i> :: <i>cam</i> ^R	Zientz et al. (1998)
IMW385	MC4100, aber λ [Φ (<i>dctA</i> '-' <i>lacZ</i>) <i>hyb</i> , <i>bla</i> ⁺]	Kleefeld (2002)
IMW386	P1 (MDO800) x IMW385 λ [Φ (<i>dctA</i> '-' <i>lacZ</i>) <i>hyb</i> , <i>bla</i> ⁺], aber <i>dctA</i> :: <i>spcR</i>	Kleefeld (2002)
IMW480	MG1655, aber <i>dcuS</i> :: <i>cam</i> ^R	Witan et al. (2012a)
IMW503	MC4100, aber λ [Φ (<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i>) <i>hyb</i> , <i>bla</i> ⁺] Δ <i>dcuB</i>	Kleefeld et al. (2009)
IMW536	MC4100, aber λ [Φ (<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i>) <i>hyb</i> , <i>bla</i> ⁺], aber <i>dcuS</i> :: <i>spec</i> ^R <i>dcuB</i> :: <i>cam</i> ^R	Kleefeld et al. (2009)
JM109	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>), F ⁺ [<i>traD36</i> <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^f <i>lacZ</i> Δ M15]	Yanisch-Perron et al. (1985)
MC4100	F ⁻ <i>araD139</i> , Δ (<i>argF-lac</i>)U169, <i>rpsL150</i> , Δ <i>lacZ</i> , <i>relA1</i> , <i>flbB530</i> , <i>deoC1</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i>	Silhavy et al. (1984)
MDO800	AN387, aber <i>dctA</i> :: <i>Spc</i> ^R	Davies et al. (1999)
MG1655	F ⁻ , λ ⁻ , <i>rph-1</i>	Jensen (1993)
NT326	F ⁻ <i>araD139</i> Δ <i>lacUI69</i> <i>rpsL</i> <i>thi</i> Δ <i>malE444</i> <i>recAI</i>	Treptow & Shuman (1985)
SU101	<i>lexA71</i> :: <i>Tn5</i> (<i>Def</i>) <i>sulA211</i> Δ (<i>lacI</i> POZYA)169/ <i>F'</i> <i>lacI</i> <i>lacZ</i> Δ M15:: <i>Tn9</i>	Dmitrova et al. (1998)

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	Stamm zur gerichteten Mutagenese: F-, <i>recA1</i> -, (<i>mk+</i> , <i>rk</i> -) <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , λ - , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , (<i>lac</i> -) [F-, <i>proAB</i> , <i>lacIq</i> , Z Δ M15 Tn10(<i>tet</i> ^R)]	Stratagene
XL10-Gold	Stamm zur gerichteten Mutagenese: <i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96</i> <i>relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB</i> <i>lacIqZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cam^R)]</i>	Stratagene

Tab. M2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

DctA-Plasmide für die Komplementationsstudien

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pBAD18-Kan	Expressionsvektor; pBR322 ori, P _{BAD} -Promotor, Kan ^R	Guzman et al. (1995)
pBAD18-Kan*	pBAD18-Kan, aber eine <i>Hind</i> III-Schnittstelle deletiert, Kan ^R	Scheu et al. (2010a)
pMW1194	Expressionsplasmid von His-DctA-His, pBAD18-Kan*-Derivat, Kan ^R	Witan et al. (2012a)
pMW2025	pMW1194, aber T73S, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2026	pMW1194, aber I87F, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2027	pMW1194, aber L219Q, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1878	pMW1194, aber S267A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1879	pMW1194, aber S267R, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1948	pMW1194, aber S267R/L302m/L309Q/A384T, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2089	pMW1194, aber S268A/G102S, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1944	pMW1194, aber S269A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2091	pMW1194, aber E270A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2086	pMW1194, aber E270S, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1880	pMW1194, aber T296A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1945	pMW1194, aber N301A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1857	pMW1194, aber L302A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1858	pMW1194, aber L302M, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1882	pMW1194, aber L302M/L309Q, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1952	pMW1194, aber L302M/L309Q/A384T, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1859	pMW1194, aber D303A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2082	pMW1194, aber G304A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1946	pMW1194, aber T305A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2029	pMW1194, aber Y308A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1860	pMW1194, aber L309A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1861	pMW1194, aber L309Q, Kan ^R	Diese Arbeit

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW1862	pMW1194, aber S340A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1863	pMW1194, aber K341A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2090	pMW1194, aber K341I/G104E, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2081	pMW1194, aber A343T, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2087	pMW1194, aber G345A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2083	pMW1194, aber T347P, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2085	pMW1194, aber G348A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1864	pMW1194, aber D376A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1865	pMW1194, aber R377A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2151	pMW1194, aber R377I, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1866	pMW1194, aber S380A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1868	pMW1194, aber S380D, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2157	pMW1194, aber S380E, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1867	pMW1194, aber S380I, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2159	pMW1194, aber S380N, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2158	pMW1194, aber S380Q, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1869	pMW1194, aber E381A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2160	pMW1194, aber E381N, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1881	pMW1194, aber R383A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2161	pMW1194, aber R383N, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1870	pMW1194, aber A384Q, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1871	pMW1194, aber A384T, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1947	pMW1194, aber N387A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2084	pMW1194, aber N391A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2088	pMW1194, aber N391D, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2162	pMW1194, aber T395I, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1484	pMW1194, aber E404A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2028	pMW1194, aber E404D, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2152	pMW1194, aber E404N, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1485	pMW1194, aber L405A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1476	pMW1194, aber D406A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2153	pMW1194, aber D406N, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1477	pMW1194, aber L410A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2154	pMW1194, aber D411N, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2155	pMW1194, aber D412N, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1271	pMW1194, aber L414A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1274	pMW1194, aber R417A, Kan ^R	Diese Arbeit

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW1275	pMW1194, aber A418S, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1276	pMW1194, aber P419A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1277	pMW1194, aber D420A, Kan ^R	Diese Arbeit
pET28a	Expressionsvektor; pBR322 ori, T7 Promotor, His6-Tag, Kan ^R	Novagen
pMW457	DctA Expressionsplasmid mit natürlichem Promotor, pET28a-Derivat, Kan ^R	Bauer (2010)
pMW2156	pMW457, aber die <i>EcoRV</i> Schnittstelle an Position (3794-3799) wurde entfernt, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2030	pMW1194, aber die <i>EcoRV</i> Schnittstelle an Position (5979-5984) wurde entfernt, Kan ^R	Diese Arbeit

DcuS-Plasmide für die Funktionsstudien

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW181	DcuS Expressionsplasmid (2.2 kb <i>XbaI/HindIII</i> Fragment), pET28a-Derivat, Kan ^R	Janausch et al. (2002b)
pMW776	pMW181, aber DcuS-M24A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW777	pMW181, aber DcuS-S26A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW849	pMW181, aber DcuS-A27G/S31C, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW236	pMW181, aber DcuS-H110A, Kan ^R	Krämer et al. (2007)
pMW827	pMW181, aber DcuS-S186C, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW1203	pMW181, aber DcuS-V187A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW1204	pMW181, aber DcuS-L188A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW779	pMW181, aber DcuS-F189A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW819	pMW181, aber DcuS-G190A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW851	pMW181, aber DcuS-M191A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1205	pMW181, aber DcuS-L192A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW1206	pMW181, aber DcuS-V193A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW841	pMW181, aber DcuS-G194A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW1207	pMW181, aber DcuS-L195A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW778	pMW181, aber DcuS-L201A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW852	pMW181, aber DcuS-W185A/F189A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW809	pMW181, aber DcuS-S186C/G190A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW1426	pMW181, aber DcuS-S186C/G194A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW813	pMW181, aber DcuS-G190A/G194A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW853	pMW181, aber DcuS-G194A/T198A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW421	pMW181, aber DcuS-N248D, Kan ^R	Monzel et al. (2013)
pMW667	pMW181, aber DcuS-V276A, Kan ^R	Monzel et al. (2013)

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW922	pMW181, aber DcuS-L300A, Kan ^R	Monzel et al. (2013)
pMW488	pMW181, aber DcuS-N304D, Kan ^R	Monzel et al. (2013)
pMW1802	pMW181, aber DcuS-H110A/G190A/G194A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1803	pMW181, aber DcuS-G190A/G194A/N248D, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1804	pMW181, aber DcuS-G190A/G194A/V276A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1805	pMW181, aber DcuS-G190A/G194A/L300A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1806	pMW181, aber DcuS-G190A/G194A/N304D, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW151	His ₆ -DcuS Expressionsplasmid, pET28-Derivat, Kan ^R	Janausch et al. (2002b)
pMW1208	pMW151, aber DcuS-G190A/G194A, Kan ^R	Steinmetz (2010)

DcuR-Plasmide für die Komplementationstudien

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW180	DcuR-E15G Expressionsplasmid; pET28a-Derivat, Kan ^R	Janausch et al. (2002b)
pMW266	pMW180, mit Rückmutation zu wildtypischen DcuR, Kan ^R	Diese Arbeit
pBAD30	Expressionsvektor; pACYC ori, P _{BAD} -Promotor, Amp ^R	Guzman et al. (1995)
pMW643	pBAD30 mit zusätzlich Tetracyclin-Resistenz, Amp ^R Tet ^R	Scheu et al. (2010a)
pMW1740	DcuR Expressionsplasmid; pMW643-Derivat, Amp ^R Tet ^R	Diese Arbeit

Plasmide für die BACTH-Interaktionsmessungen

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pUT18C	Expressionsplasmid für die N-terminalen T18-Fusionen, pUC19-Derivat, Amp ^R	Karimova et al. (2005)
pKT25	Expressionsplasmid für die N-terminalen T25-Fusionen, pSU40-Derivat, Kan ^R	Karimova et al. (2005)
pUT18	Expressionsplasmid für die C-terminalen T18-Fusionen, pUC19-Derivat, Amp ^R	Karimova et al. (2005)
pKNT25	Expressionsplasmid für die C-terminalen T25-Fusionen, pSU40-Derivat, Kan ^R	Karimova et al. (2005)
pUT18C-zip	T18-Zip Expressionsplasmid, pUT18C-Derivat, Amp ^R	Karimova et al. (2005)
pKT25-zip	T25-Zip Expressionsplasmid, pKT25-Derivat, Kan ^R	Karimova et al. (2005)
pMW917	T18-DctA Expressionsplasmid, pU18C-Derivat, Amp ^R	Witan et al. (2012a)
pMW2169	pMW917, aber DctA-N301A, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW2172	pMW917, aber DctA-S380A, Amp ^R	Diese Arbeit

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW2173	pMW917, aber DctA-S380D, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW2174	pMW917, aber DctA-S380I, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW856	T25-DctA Expressionsplasmid, pKT25-Derivat, Kan ^R	Monzel et al. (2013)
pMW2163	pMW856, aber DctA-N301A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2165	pMW856, aber DctA-S380A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2166	pMW856, aber DctA-S380D, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2167	pMW856, aber DctA-S380I, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW858	DctA-T25 Expressionsplasmid, pKNT25-Derivat, Kan ^R	Witan et al. (2012a)
pMW427	T25-DcuR Expressionsplasmid, pKT25-Derivat, Kan ^R	Scheu et al. (2012)
pMW429	T18-DcuS Expressionsplasmid, pUT18C-Derivat, Amp ^R	Scheu et al. (2012)
pMW1834	pMW429, aber DcuS-S26A, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1836	pMW429, aber DcuS-A27G/S31C, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1752	pMW429, aber DcuS-S186C, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1210	pMW429, aber DcuS-S186C/G190A, Amp ^R	Steinmetz (2010)
pMW1712	pMW429, aber DcuS-S186P, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1754	pMW429, aber DcuS-G190A, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1212	pMW429, aber DcuS-G190A/G194A, Amp ^R	Steinmetz (2010)
pMW1755	pMW429, aber DcuS-G194A, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW426	T25-DcuS Expressionsplasmid, pKT25-Derivat, Kan ^R	Scheu et al. (2012)
pMW1831	pMW426, aber DcuS-S26A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1833	pMW426, aber DcuS-A27G/S31C, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1748	pMW426, aber DcuS-S186C, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1209	pMW426, aber DcuS-S186C/G190A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW1711	pMW426, aber DcuS-S186P, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1750	pMW426, aber DcuS-G190A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1211	pMW426, aber DcuS-G190A/G194A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW1751	pMW426, aber DcuS-G194A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW948	DcuS-TM2-T18 Expressionsplasmid, pUT18-Derivat, Amp ^R	Monzel et al. (2013)
pMW1213	pMW948, aber DcuS-S186C/G190A, Amp ^R	Steinmetz (2010)
pMW1215	pMW948, aber DcuS-G190A/G194A, Amp ^R	Steinmetz (2010)
pMW949	DcuS-TM2-T25 Expressionsplasmid, pKNT25-Derivat, Kan ^R	Monzel et al. (2013)
pMW1214	pMW949, aber DcuS-S186C/G190A, Kan ^R	Steinmetz (2010)
pMW1216	pMW949, aber DcuS-G190A/G194A, Kan ^R	Steinmetz (2010)

Plasmide für die GALLEX-Interaktionsmessungen

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pBLM 100	Expressionsplasmid für GALLEX-Chimären mit N-terminaler LexA und C-terminaler MBP-Fusion, pBR322-Derivat, Amp ^R	Schneider & Engelman (2003)
pBLM GpA	LexA-TM _{GpA[17]} -MBP Expressionsplasmid, pBLM100-Derivat, Amp ^R	Schneider & Engelman (2003)
pBLM GpA-G83I	pBLM GpA, aber GpA-G83I, Amp ^R	Schneider & Engelman (2003)
pMW1967	LexA-TM1 _{DcuS[17]} -MBP Expressionsplasmid, pBLM100-Derivat, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1968	LexA-TM1 _{DcuS[16]} -MBP Expressionsplasmid, pBLM100-Derivat, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1969	pMW1968, aber DcuS-S26R, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1960	LexA-TM2 _{DcuS[20]} -MBP Expressionsplasmid, pBLM100-Derivat, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1961	LexA-TM2 _{DcuS[17]} -MBP Expressionsplasmid, pBLM100-Derivat, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1962	pMW1961, aber DcuS-G190A/G194A, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1963	LexA-TM2 _{DcuS[16]} -MBP Expressionsplasmid, pBLM100-Derivat, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1965	pMW1963, aber DcuS-S186C/G190A, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1964	pMW1963, aber DcuS-G190A/G194A, Amp ^R	Diese Arbeit

Plasmide für die Lokalisierungsstudien dieser Arbeit

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pEYFP	Plasmid mit der GFP-Variante "enhanced" YFP, Amp ^R	Clontech
pMW391	Expressionsplasmid für C-terminale YFP-Fusionen, pET28a-Derivat, Kan ^R	Scheu et al. (2008)
pMW392	Expressionsplasmid für N-terminale YFP-Fusionen, pET28a-Derivat, Kan ^R	Scheu et al. (2008)
pMW407	DcuS-YFP Expressionsplasmid, pBAD30-Derivat, Amp ^R	Scheu et al. (2008)
pMW1201	pMW407, aber DcuS-YFP-S186C/G190A, Amp ^R	Steinmetz (2010)
pMW1200	pMW407, aber DcuS-YFP-G190A/G194A, Amp ^R	Steinmetz (2010)
pMW1891	pMW407, aber YFP-A206K, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW526	DctA-YFP Expressionsplasmid, pBAD30-Derivat, Amp ^R	Witan et al. (2012a)
pMW1081	DcuR-YFP Expressionsplasmid, pET28a-Derivat, Kan ^R	Scheu (unveröffentlicht)
pMW1739	DcuR-YFP Expressionsplasmid, pMW643-Derivat, Amp ^R Tet ^R	Diese Arbeit

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW1741	YFP-DcuR Expressionsplasmid, pMW643-Derivat, Amp ^R Tet ^R	Diese Arbeit
pMW1953	mYFP(A206K)-linker-DcuR Expressionsplasmid, pMW643-Derivat, Amp ^R Tet ^R	Diese Arbeit
pArno	DauA, Kan ^R	Javelle (unveröffentlicht)
pMW1900	DauA-mYFP(A206K) Expressionsplasmid, pET28a-Derivat, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1901	mYFP(A206K)-DauA Expressionsplasmid, pET28a-Derivat, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1954	DauA-mYFP(A206K) Expressionsplasmid, pBAD30-Derivat, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW2031	mYFP(A206K)-DauA Expressionsplasmid, pBAD30-Derivat, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW1390	His ₆ DcuS Expressionsplasmid, pBAD18-Kan*-Derivat, Kan ^R	Witan et al. (2012a)

Plasmide für das modifizierte BACTH-System

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pALT18iiGpA	T18-TM _{GpA} -MBP Expressionsplasmid, Cam ^R	Steindorf (unveröffentlicht)
pALT18iiGpA-G83I	T18-TM _{GpA} -MBP(G83I) Expressionsplasmid, Cam ^R	Steindorf (unveröffentlicht)
pALT18iiDcuSTMD1(a)	T18-TM1 _{DcuS} -MBP Expressionsplasmid, Cam ^R	Steindorf (unveröffentlicht)
pAMT18iiDcuSTMD1(a)	MBP-TM1 _{DcuS} -T18 Expressionsplasmid, Cam ^R	Steindorf (unveröffentlicht)
pBLT25iiGpA	T25-TM _{GpA} -MBP Expressionsplasmid, Amp ^R	Steindorf (unveröffentlicht)
pBLT25iiGpA-G83I	T25-TM _{GpA} -MBP(G83I) Expressionsplasmid, Amp ^R	Steindorf (unveröffentlicht)
pBMT25iiDcuSTMD2(b)	MBP-TM2 _{DcuS} -T25 Expressionsplasmid, Amp ^R	Steindorf (unveröffentlicht)
pBLT25iiDcuSTMD2(b)	T25-TM2 _{DcuS} -MBP Expressionsplasmid, Amp ^R	Steindorf (unveröffentlicht)

Tab. M3: Mutageneseprimer

DctA-Varianten

Name	Sequenz (5'-3')	T _M [°C]	Austausch
DctA_T73S_for	GGC GGT CGG TCG TTC CGG CGC AGT CGC AC	72,8	T73S
DctA_T73S_rev	GTG CGA CTG CGC CGG AAC GAC CGA CCG CC	72,8	T73S
DctA_I87F_for	GAA ATT GTC AGT ACC TTC GCG CTG ATT ATT G	60,4	I87F
DctA_I87F_rev	CAA TAA TCA GCG CGA AGG TAC TGA CAA TTT C	60,4	I87F
DctA_L219Q_for	CAC ACT GGT GCA ACA GGG GCA GCT GAT TAT C	65,7	L219Q

Name	Sequenz (5'-3')	T _M [°C]	Austausch
DctA_L219Q_rev	GAT AAT CAG CTG CCC CTG TTG CAC CAG TGT G	65,7	L219Q
DctA-S267Afor	GTA CTG GGG ACT GCA TCT TCC GAG TCG	64,3	S267A
DctA-S267Arev	CGA CTC GGA AGA TGC AGT CCC CAG TAC	64,3	S267A
DctA-S267Rfor	GTA CTG GGG ACT CGA TCT TCC GAG TCG	64,3	S267R
DctA-S267Rrev	CGA CTC GGA AGA TCG AGT CCC CAG TAC	64,3	S267R
DctA_S268A_for	TAC TGG GGA CTT CAG CTT CCG AGT CGG CG	67,2	S268A
DctA_S268A_rev	CGC CGA CTC GGA AGC TGA AGT CCC CAG TA	67,2	S268A
DctA-S269Afor	GAC TTC ATC TGC CGA GTC GGC GCT GCC G	68,7	S269A
DctA-S269Arev	CGG CAG CGC CGA CTC GGC AGA TGA AGT C	68,7	S269A
DctA_E270A_for	ACT TCA TCT TCC GCG TCG GCG CTG CCG	67,3	E270A
DctA_E270A_rev	CGG CAG CGC CGA CGC GGA AGA TGA AGT	67,3	E270A
DctA_E270S_for	GGA CTT CAT CTT CCT CGT CGG CGC TGC CGC	69,8	E270S
DctA_E270S_rev	GCG GCA GCG CCG ACG AGG AAG ATG AAG TCC	69,8	E270S
DctA-T296A-for	GGC TGG TCA TCC CGG CAG GCT ACT CG	67,4	T296A
DctA-T296A-rev	CGA GTA GCC TGC CGG GAT GAC CAG CC	67,4	T296A
DctA-N301Afor	CAG GCT ACT CGT TTG CCC TTG ATG GCA CAT C	65,7	N301A
DctA-N301Arev	GAT GTG CCA TCA AGG GCA AAC GAG TAG CCT G	65,7	N301A
DctA-L302Afor	CTA CTC GTT TAA CGC TGA TGG CAC ATC G	61,4	L302A
DctA-L302Arev	CGA TGT GCC ATC AGC GTT AAA CGA GTA G	61,4	L302A
DctA-L302Mfor	CTA CTC GTT TAA CAT GGA TGG CAC ATC G	59,9	L302M
DctA-L302Mrev	CGA TGT GCC ATC CAT GTT AAA CGA GTA G	59,9	L302M
DctA-D303A-for	GGC TAC TCG TTT AAC CTT GCT GGC ACA TCG	64,4	D303A
DctA-D303A-rev	CGA TGT GCC AGC AAG GTT AAA CGA GTA GCC	64,4	D303A
DctA_G304A_for	ACT CGT TTA ACC TTG ATG CCA CAT CGA TAT ACC TGA C	64,5	G304A
DctA_G304A_rev	GTC AGG TAT ATC GAT GTG GCA TCA AGG TTA AAC GAG T	64,5	G304A
DctA-T305Afor	GTT TAA CCT TGA TGG CGC ATC GAT ATA CCT G	61,7	T305A
DctA-T305Arev	CAG GTA TAT CGA TGC GCC ATC AAG GTT AAA C	61,7	T305A
DctA-Y308Afor	GAT GGC ACA TCG ATA GCC CTG ACA ATG GCG GC	68,2	Y308A
DctA-Y308Arev	GCC GCC ATT GTC AGG GCT ATC GAT GTG CCA TC	68,2	Y308A
DctA-L309Afor	CAC ATC GAT ATA CGC GAC AAT GGC GGC GG	65,7	L309A
DctA-L309Arev	CCG CCG CCA TTG TCG CGT ATA TCG ATG TG	65,7	L309A
DctA-L309Qfor	CAC ATC GAT ATA CCA GAC AAT GGC GGC	61,3	L309M
DctA-L309Qrev	GCC GCC ATT GTC TGG TAT ATC GAT GTG	61,3	L309M
DctA-S340A-for	GCT GCT TTC TGC TAA AGG GGC GGC AGG G	67,2	S340A
DctA-S340A-rev	CCC TGC CGC CCC TTT AGC AGA AAG CAG C	67,2	S340A
DctA-K341A-for	GCT GCT TTC TTC TGC AGG GGC GGC AGG G	68,7	K341A

Name	Sequenz (5'-3')	T _M [°C]	Austausch
DctA-K341A-rev	CCC TGC CGC CCC TGC AGA AGA AAG CAG C	68,7	K341A
DctA_K341I_for	TCG TGT TGC TGC TTT CTT CTA TAG GGG CGG CAG	66,9	K341I
DctA_K341I_rev	CTG CCG CCC CTA TAG AAG AAA GCA GCA ACA CGA	66,9	K341I
DctA_A343T_for	CTT TCT TCT AAA GGG ACG GCA GGG GTA ACG G	65,7	A343T
DctA_A343T_rev	CCG TTA CCC CTG CCG TCC CTT TAG AAG AAA G	65,7	A343T
DctA_G345A_for	AAG GGG CGG CAG CGG TAA CGG GTA G	65,9	G345A
DctA_G345A_rev	CTA CCC GTT ACC GCT GCC GCC CCT T	65,9	G345A
DctA_T347A_for	GGG CGG CAG GGG TAG CGG GTA GTG	67,6	T347A
DctA_T347A_rev	CAC TAC CCG CTA CCC CTG CCG CCC	67,6	T347A
DctA_T347P_for	GGG CGG CAG GGG TAC CGG GTA GTG	67,6	T347P
DctA_T347P_rev	CAC TAC CCG GTA CCC CTG CCG CCC	67,6	T347P
DctA_G348A_for	GGC AGG GGT AAC GGC TAG TGG CTT TAT CG	65,7	G348A
DctA_G348A_rev	CGA TAA AGC CAC TAG CCG TTA CCC CTG CC	65,7	G348A
DctA-D376A-for	CCT CGG TAT CGC CCG CTT TAT GTC AGA AGC	65,7	D376A
DctA-D376A-rev	GCT TCT GAC ATA AAG CGG GCG ATA CCG AGG	65,7	D376A
DctA-R377Afor	CCT CGG TAT CGA CGC CTT TAT GTC AGA AG	62,9	R377A
DctA-R377Arev	CTT CTG ACA TAA AGG CGT CGA TAC CGA GG	62,9	R377A
DctA-R377I_for	GCT GAT CCT CGG TAT CGA CAT CTT TAT GTC AGA AGC TCG T	67,6	R377I
DctA-R377I_rev	ACG AGC TTC TGA CAT AAA GAT GTC GAT ACC GAG GAT CAG C	67,6	R377I
DctA-S380A-for	CGA CCG CTT TAT GGC AGA AGC TCG TGC GC	67,2	S380A
DctA-S380A-rev	GCG CAC GAG CTT CTG CCA TAA AGC GGT CG	67,2	S380A
DctA-S380Dfor	CGA CCG CTT TAT GGA TGA AGC TCG TGC GC	65,7	S380D
DctA-S380Drev	GCG CAC GAG CTT CAT CCA TAA AGC GGT CG	65,7	S380D
DctA-S380E_for	CCT CGG TAT CGA CCG CTT TAT GGA GGA AGC TCG TGC GCT G	72,7	S380E
DctA-S380E_rev	CAG CGC ACG AGC TTC CTC CAT AAA GCG GTC GAT ACC GAG G	72,7	S380E
DctA-S380I-for	GTA TCG ACC GCT TTA TGA TAG AAG CTC GTG CGC TG	66,8	S380I
DctA-S380I-rev	CAG CGC ACG AGC TTC TAT CAT AAA GCG GTC GAT AC	66,8	S380I
DctA-S380N_for	CCT CGG TAT CGA CCG CTT TAT GAA TGA AGC TCG TGC GCT G	70,6	S380N
DctA-S380N_rev	CAG CGC ACG AGC TTC ATT CAT AAA GCG GTC GAT ACC GAG G	70,6	S380N
DctA-S380Q_for	CCT CGG TAT CGA CCG CTT TAT GCA GGA AGC TCG TGC GCT G	72,7	S380Q
DctA-S380Q_rev	CAG CGC ACG AGC TTC CTG CAT AAA GCG GTC GAT ACC GAG G	72,7	S380Q
DctA-E381A-for	CGA CCG CTT TAT GTC AGC AGC TCG TGC GC	67,2	E381A
DctA-E381A-rev	GCG CAC GAG CTG CTG ACA TAA AGC GGT CG	67,2	E381A
DctA-E381N_for	TCG GTA TCG ACC GCT TTA TGT CAA ATG CTC GTG CGC TG	68,8	E381N
DctA-E381N_rev	CAG CGC ACG AGC ATT TGA CAT AAA GCG GTC GAT ACC GA	68,8	E381N
DctA-R383A-for	GCT TTA TGT CAG AAG CTG CTG CGC TGA CTA ACC	65,6	R383A

Name	Sequenz (5'-3')	T _M [°C]	Austausch
DctA-R383A-rev	GGT TAG TCA GCG CAG CAG CTT CTG ACA TAA AGC	65,6	R383A
DctA-R383N_for	TAT CGA CCG CTT TAT GTC AGA AGC TAA TGC GCT GAC TAA C	66,5	R383N
DctA-R383N_rev	GTT AGT CAG CGC ATT AGC TTC TGA CAT AAA GCG GTC GAT A	66,5	R383N
DctA-A384Qfor	GTC AGA AGC TCG TCA GCT GAC TAA CCT G	62,9	A384Q
DctA-A384Qrev	CAG GTT AGT CAG CTG ACG AGC TTC TGA C	62,9	A384Q
DctA-A384Tfor	GTC AGA AGC TCG TAC GCT GAC TAA CCT G	62,9	A384T
DctA-A384Trev	CAG GTT AGT CAG CGT ACG AGC TTC TGA C	62,9	A384T
DctA-N387Afor	CTC GTG CGC TGA CTG CCC TGG TCG GTA ACG	69,8	N387A
DctA-N387Arev	CGT TAC CGA CCA GGG CAG TCA GCG CAC GAG	69,8	N387A
DctA_N391A_for	GCT GAC TAA CCT GGT CGG TGC CGG CGT AGC G	71	N391A
DctA_N391A_rev	CGC TAC GCC GGC ACC GAC CAG GTT AGT CAG C	71	N391A
DctA_N391D_for	GCT GAC TAA CCT GGT CGG TGA CGG CGT AGC	68,5	N391D
DctA_N391D_rev	GCT ACG CCG TCA CCG ACC AGG TTA GTC AGC	68,5	N391D
DctA-T395I_for	GGT AAC GGC GTA GCG ATC ATT GTC GTT GCT AAG	65,6	T395I
DctA-T395I_rev	CTT AGC AAC GAC AAT GAT CGC TAC GCC GTT ACC	65,6	T395I
DctA-E404A-f	CTA AGT GGG TGA AAG CAC TGG ACC ACA AAA	61,6	E404A
DctA-E404A-r	TTT TGT GGT CCA GTG CTT TCA CCC ACT TAG	61,6	E404A
DctA_E404D_for	GTG GGT GAA AGA CCT GGA CCA CAA AAA AC	61,5	E404D
DctA_E404D_rev	GTT TTT TGT GGT CCA GGT CTT TCA CCC AC	61,5	E404D
DctA-E404N_for	GTC GTT GCT AAG TGG GTG AAA AAT CTG GAC CAC AAA AAA CTG G	67,4	E404N
DctA-E404N_rev	CCA GTT TTT TGT GGT CCA GAT TTT TCA CCC ACT TAG CAA CGA C	67,4	E404N
DctA-L405A-f	GTG GGT GAA AGA AGC GGA CCA CAA AAA ACT	61,6	L405A
DctA-L405A-r	AGT TTT TTG TGG TCC GCT TCT TTC ACC CAC	61,6	L405A
DctA-D406A-f	GTG AAA GAA CTG GCC CAC AAA AAA CTG GAC	61,6	D406A
DctA-D406A-r	GTC CAG TTT TTT GTG GGC CAG TTC TTT CAC	61,6	D406A
DctA-D406N_for	AAG TGG GTG AAA GAA CTG AAC CAC AAA AAA CTG GAC G	64,5	D406N
DctA-D406N_rev	CGT CCA GTT TTT TGT GGT TCA GTT CTT TCA CCC ACT T	64,5	D406N
DctA-L410A-f	TGG ACC ACA AAA AAG CGG ACG ATG TGC TGA	63	L410A
DctA-L410A-r	TCA GCA CAT CGT CCG CTT TTT TGT GGT CCA	63	L410A
DctA-D411N_for	ACT GGA CCA CAA AAA ACT GAA CGA TGT GCT GAA TAA TCG	64,5	D411N
DctA-D411N_rev	CGA TTA TTC AGC ACA TCG TTC AGT TTT TTG TGG TCC AGT	64,5	D411N
DctA-D412N_for	GGA CCA CAA AAA ACT GGA CAA TGT GCT GAA TAA TCG TGC	65,5	D412N
DctA-D412N_rev	GCA CGA TTA TTC AGC ACA TTG TCC AGT TTT TTG TGG TCC	65,5	D412N
DctA-L414A-f	CTG GAC GAT GTG GCG AAT AAT CGT GCG CCG	67,1	L414A
DctA-L414A-r	CGG CGC ACG ATT ATT CGC CAC ATC GTC CAG	67,1	L414A
DctA-R417A-f	GAT GTG CTG AAT AAT GCT GCG CCG GAT GGC	65,7	R417A

Name	Sequenz (5'-3')	T _M [°C]	Austausch
DctA-R417A-r	GCC ATC CGG CGC AGC ATT ATT CAG CAC ATC	65,7	R417A
DctA-A418S-f	CTG AAT AAT CGT AGT CCG GAT GGC AAA ACG	61,6	A418S
DctA-A418S-r	CGT TTT GCC ATC CGG ACT ACG ATT ATT CAG	61,6	A418S
DctA-P419A-f	GAA TAA TCG TGC GGC GGA TGG CAA AAC GCA	64,4	P419A
DctA-P419A-r	TGC GTT TTG CCA TCC GCC GCA CGA TTA TTC	64,4	P419A
DctA-D420A-f	ATC GTG CGC CGG CTG GCA AAA CGC ACG AA	67,2	D420A
DctA-D420A-r	TTC GTG CGT TTT GCC AGC CGG CGC ACG AT	67,2	D420A

DcuS-Varianten

Name	Sequenz (5'-3')	T _M [°C]	Austausch
DcuS-M24A-for	GAG TAC CAC AGT GAT CTT AGC GGT CAG TGC GGT ACT G	68,9	M24A
DcuS-M24A-rev	CAG TAC CGC ACT GAC CGC TAA GAT CAC TGT GGT ACT C	68,9	M24A
DcuS-S26Afor	CAG TGA TCT TAA TGG TCG CTG CGG TAC TGT TCT CG	66,8	S26A
DcuS-S26Arev	CGA GAA CAG TAC CGC AGC GAC CAT TAA GAT CAC TG	66,8	S26A
DcuS-S26R-for	GTG ATC TTA ATG GTC AGG GCG GTA CTG	61,3	S26R
DcuS-S26R-rev	CAG TAC CGC CCT GAC CAT TAA GAT CAC	61,3	S26R
TM1-forA27G/S31C	GTC ATG GGG GTA CTG TTC TGC GTG CTA TTG	64,4	A27G/S31C
TM1-revA27G/S31C	CAA TAG CAC GCA GAA CAG TAC CCC CAT GAC	64,4	A27G/S31C
TM2-forW185A/F189A	GCA TTA TCG CGT CGG TAT TAG CTG GCA TGC	64,4	W185A/F189A
TM2-revW185A/F189A	GCA TGC CAG CTA ATA CCG ACG CGA TAA TGC	64,4	W185A/F189A
TM2-S186Afor	CGC TGG AGC ATT ATC TGG GCC CTA TTA TTT GGC	65,6	S186A
TM2-S186Arev	GCC AAA TAA TAG GGC CCA GAT AAT GCT CCA GCG	65,6	S186A
TM2-S186C_for	CGC TGG AGC ATT ATC TGG TGC GTA TTA TTT GGC	64,4	S186C
TM2-S186C_rev	GCC AAA TAA TAC GCA CCA GAT AAT GCT CCA GCG	64,4	S186C
TM2-forS186C/G190A	CGC TGG AGC ATT ATC TGG TGC GTA TTA TTT GCG ATG CTG GTC	67,6	S186C/G190A
TM2-revS186C/G190A	GAC CAG CAT CGC AAA TAA TAC GCA CCA GAT AAT GCT CCA GCG	67,6	S186C/G190A
DcuS-S186P-for	AGC ATT ATC TGG CCG GTA TTA TTT GGC ATG	60,3	S186P
DcuS-S186P-rev	CAT GCC AAA TAA TAC CGG CCA GAT AAT GCT	60,3	S186P
DcuS-V187A-for	CAT TAT CTG GTC GGC ATT ATT TGG CAT GCT GG	63,1	V187A
DcuS-V187A-rev	CCA GCA TGC CAA ATA ATG CCG ACC AGA TAA TG	63,1	V187A
DcuS-L188A-for	CAT TAT CTG GTC GGT AGC ATT TGG CAT GCT G	63	L188A
DcuS-L188A-rev	CAG CAT GCC AAA TGC TAC CGA CCA GAT AAT G	63	L188A
DcuS-F189A-for	CAT TAT CTG GTC GGT ATT AGC TGG CAT GCT GGT CGG ACT G	69,6	F189A
DcuS-F189A-rev	CAG TCC GAC CAG CAT GCC AGC TAA TAC CGA CCA GAT AAT G	69,6	F189A
TM2-G190A_for	GTA TTA TTT GCG ATG CTG GTC GGA CTG ATT GGC	64,4	G190A

Name	Sequenz (5'-3')	T _M [°C]	Austausch
TM2-G190A_rev	GCC AAT CAG TCC GAC CAG CAT CGC AAA TAA TAC	64,4	G190A
TM2-forG190A/G194A	GTA TTA TTT GCG ATG CTG GTC GCA CTG ATT GGC	64,4	G190A/G194A
TM2-revG190A/G194A	GCC AAT CAG TGC GAC CAG CAT CGC AAA TAA TAC	64,4	G190A/G194A
TM2-for_M191A	GTA TTA TTT GGC GCG CTG GTC GGA CTG	62,8	M191A
TM2-rev_M191A	CAG TCC GAC CAG CGC GCC AAA TAA TAC	62,8	M191A
DcuS-L192A-for	GTA TTA TTT GGC ATG GCG GTC GGA CTG ATT G	63	L192A
DcuS-L192A-rev	CAA TCA GTC CGA CCG CCA TGC CAA ATA ATA C	63	L192A
DcuS-V193A-for	GGC ATG CTG GCC GGA CTG ATT GGC AC	65,8	V193A
DcuS-V193A-rev	GTG CCA ATC AGT CCG GCC AGC ATG CC	65,8	V193A
TM2-for_G194A	GGC ATG CTG GTC GCA CTG ATT GGC ACC	65,8	G194A
TM2-rev_G194A	GGT GCC AAT CAG TGC GAC CAG CAT GCC	65,8	G194A
TM2-forG194A/T198A	ATG CTG GTC GCA CTG ATT GGC GCC TGC ATT CTG	68,1	G194A/T198A
TM2-revG194A/T198A	CAG AAT GCA GGC GCC AAT CAG TGC GAC CAG CAT	68,1	G194A/T198A
DcuS-L195A-for	CAT GCT GGT CGG AGC GAT TGG CAC CTG	65,8	L195A
DcuS-L195A-rev	CAG GTG CCA ATC GCT CCG ACC AGC ATG	65,8	L195A
DcuS-L201A-for	GGA CTG ATT GGC ACC TGC ATT GCG GTT AAG GTA CTG	67,9	L201A
DcuS-L201A-rev	CAG TAC CTT AAC CGC AAT GCA GGT GCC AAT CAG TCC	67,9	L201A

YFP-Mutagenese

Name	Sequenz (5'-3')	T _M [°C]	Austausch
A206K_for	GAG CTA CCA GTC CAA GCT GAG CAA AGA CC	64,3	A206K
A206K_rev	GGT CTT TGC TCA GCT TGG ACT GGT AGC TC	64,3	A206K

Tab. M4: Primer für die ungerichtete Mutagenese

Name	Sequenz (5'-3')	TM [°C]	Schnittstelle
pMW457_-EcoRV_for	GCG TTG GTG CGA ATG TCT CGG TAG TGG GAT AC	76,2	<i>EcoRV</i> deletiert
pMW457_-EcoRV_rev	GTA TCC CAC TAC CGA GAC ATT CGC ACC AAC GC	76,2	<i>EcoRV</i> deletiert
pMW1194_-EcoRV(2)-for	GCG ACG CTG GCG ACA TTA AAA TTG CTG TCT GC	75	<i>EcoRV</i> deletiert
pMW1194_-EcoRV(2)-rev	GCA GAC AGC AAT TTT AAT GTC GCC AGC GTC GC	75	<i>EcoRV</i> deletiert

Name	Sequenz (5'-3')	TM [°C]	Schnittstelle
pMW1194_EcoRV(C-Term)_for	CAC TAA CAG TCA GAT GGA TAT C	58,4	<i>EcoRV</i>
pMW457_Random_rev	GTG GTG GTG CTC GAG ATT A	57,5	<i>XhoI</i>
dctA-his-pBAD_f	CCC CTC TAG ACA ATA ATT TTG	55,4	<i>XbaI</i>
pMW1194_EcoRV(N-Term)_rev	GTG ATT TGG TGG ACG ATA TC	56,4	<i>EcoRV</i>
pMW1194_EcoRV(C-Term)_for	CAC TAA CAG TCA GAT GGA TAT C	58,4	<i>EcoRV</i>
dctA-his-pBAD_r	GTT AGA AGC TTG ATC TCA GT	54,3	<i>HindIII</i>

Tab. M5: Primer für die Konstruktion der GALLEX-Konstrukte.

TM1_{DcuS[17]}-Konstrukt

Name	Sequenz (5'-3')	TM [°C]	Schnittstelle
TM1for(17)1	GTA CCA CAG AGC TCC TTA ATG G	62,1	<i>SacI</i>
GALLEX-TM1v-17-rev	GAG AAC TAG TAA TCA GAT GCA CCA CCA AT	67,4	<i>SpeI</i>

TM1_{DcuS[16]}-Konstrukt

Name	Sequenz (5'-3')	TM [°C]	Schnittstelle
TM1for(16)	GTA CCA CGA GCT CGA TCT TAA TG	62,9	<i>SacI</i>
TM1rev(16)	GAG AAG TAA ACT AGT ATG CAC C	58,4	<i>SpeI</i>

TM2_{DcuS[20]}-Konstrukt

Name	Sequenz (5'-3')	TM [°C]	Schnittstelle
G-TM2_compl-for	GTC GCT GGA GCT CCA TTA TCT G	64,2	<i>SacI</i>
G-TM2_compl-rev	TCA GTA CTA GTA ACC AGA ATG CAG	62	<i>SpeI</i>

TM2_{DcuS[17]}-Konstrukt

Name	Sequenz (5'-3')	TM [°C]	Schnittstelle
TM2for(17)2	TCG CTG GAG CTC TAT CTG GTC	63,2	<i>SacI</i>
TM2rev(17)2	GTA CCT TAA CTA GTA ATG CAG GTG	62	<i>SpeI</i>

TM2_{DcuS[16]}-Konstrukt

Name	Sequenz (5'-3')	TM [°C]	Schnittstelle
G-TM2_compl-for	GTC GCT GGA GCT CCA TTA TCT G	64,2	<i>SacI</i>
TM2_17_rev	AAC CAG ACT AGT GGT GCC AAT C	62,1	<i>SpeI</i>

Tab. M6: Primer zur Konstruktion der YFP-Fusionen von DcuR.

Name	Sequenz (5'-3')	TM [°C]	Schnittstelle
dcuR_n-T_EcoRI for	GGT GCC GCG CGG CGA ATT CAT GAT CAA TG	74,8	<i>EcoRI</i>
dcuR_n-T_EcoRI rev	CAT TGA TCA TGA ATT CGC CGC GCG GCA CC	74,8	<i>EcoRI</i>
dcuR-C-XbaI-for	GCC AAT AAA GCT CTA GAC GGC CGC ACT C	73	<i>XbaI</i>
dcuR-C-XbaI-rev	GAG TGC GGC CGT CTA GAG CTT TAT TGG C	73	<i>XbaI</i>
YFP-SpeI-DcuR-for	CTG TAC AAG GAA TTC GCG ACT AGT ATG ATC AAT GTA TTA ATT ATC	74,2	<i>SpeI</i>
YFP-SpeI-DcuR-rev	GAT AAT TAA TAC ATT GAT CAT ACT AGT CGC GAA TTC CTT GTA CAG	74,2	<i>SpeI</i>
Linker-for	AAT TCA ACA ATA ACA ATC TCG GAA TCG ACA CTA CGG AGA ACC TGT ATT TCC AGG GTA TGT CGT CTG GCC TAG TCC CAC GTG GCA GCG CTG GTA GTA GGG GAG CAA	91,6	<i>EcoRI/SpeI</i>
Linker-rev	CTA GTT GCT CCC CTA CTA CCA GCG CTG CCA CGT GGG ACT AGG CCA GAC GAC ATA CCC TGG AAA TAC AGG TTC TCC GTA GTG TCG ATT CCG AGA TTG TTA TTG TTG	92,4	<i>EcoRI/SpeI</i>

Tab. M7: Primer zur Konstruktion der YFP-Fusionen von DauA.

Name	Sequenz (5'-3')	TM [°C]	Schnittstelle
yehM(C)for	AGA AGG AGA CTC CAT ATG CCT TTC C	65,8	<i>NdeI</i>
yehM(C)rev	GTA CAG GTT GGA TCC GTA TAA ATC CG	66,2	<i>BamHI</i>
YehM(N)for	AAG AAG GAA AGC TTC GAT GCC TTT CCG C	70,1	<i>HindIII</i>
YehM(N)rev	CTG GAA GTA CAG GTC TCG AGT TAA TAA ATC C	69,7	<i>XhoI</i>
Yfp(N) for	GG ATT TAT TAA CTC TAG A AC CAC CAC CAC C	69,2	<i>XbaI</i>
Yfp(N) rev	GGT GGT GGT GGT TCT AGA GTT AAT AAA TCC	69,2	<i>XbaI</i>
Yfp(C)for	TGT ACA AGG AAT TCT AGA TCC GTC GAC AAG	69,2	<i>XbaI</i>
Yfp(C)rev	CTT GTC GAC GGA TCT AGA ATT CCT TGT ACA	69,2	<i>XbaI</i>
pBAD30-yfp-	GGC GGA TTT ATA AAC TCT AGA GTC GAC	66,6	Stoppcodon
yehM_c-stop_for			eingefügt
pBAD30-yfp-	GTC GAC TCT AGA GTT TAT AAA TCC GCC	66,6	Stoppcodon
yehM_c-stop_rev			eingefügt

Tab. M8: Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz (5'-3')	TM [°C]
pMW1194_seq_for	CCC GTT TTT TTG GGC TAG CG	60,5
pMW1194_seq_rev2	CGC TTC TGC GTT CTG ATT TAA TC	60,9
midDcuS	GTT TTC TGG CGC AGG CTT TAC GC	66,6
PiDcuS_seq2	CAC TGC CAG TGC CTT GTT GGC TAG CCC	74,4
pKNT25-seq_for	CAC ACA GGA AAC AG CTAT GAC	57,9
pKNT25-seq_rev	GTC GGC GGC GTT TGC GTA	60,5
pKT25-seq_for2	GCG ATT CGG TGA CCG ATT AC	59,3
pKT25-seq_rev	GGA TGT GCT GCA AGG CGA TT	59,3
pUT18-Seq-for	CCA AGC TTG CAT GCC TGC	58,2
pUT18-Seq-rev	CGA CGC GCC TCG GTG CCC AC	69,9
pUT18C-for-seq	CTG GAA ACG GTG CCG GCG TC	65,5
pUT18C-rev-seq	CGG GGC TGG CTT AAC TAT GC	61,4
GALLEX-Seq	CGG CAT CCC AGG TAA ACG	58,4
T7	CTA GTT ATT GCT CAG CGG T	55
T7 term	CTC TTG CCA GTC ACG TTA C	57,6

3.2 Kultivierung und Medien

3.2.1 Medien und Puffer

Alle Medien und Puffer wurden vor Gebrauch entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle A1 im Anhang zusammengefasst.

LB-Medium (Bertani 1951)

10 g/l Pepton aus Casein; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl

Es wurde ebenfalls eine Fertigmischung (X964.1, Roth) verwendet.

eM9-Medium (Miller 1992)

10 x M9 Stammlösung (pH 7,0):

75 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 30 g/l KH₂PO₄; 5 g/l NaCl; 10 g/l NH₄Cl

Zusätze (separat autoklaviert)

10 ml/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (10mM); 1 ml/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (1 M); 10 ml/l säurehydrolysiertes Casein (AHC) (10%); 5 ml/l L-Tryptophan (1%)

Kohlenstoffquelle, Elektronenakzeptor und Effektoren

Dimethylsulfoxid (DMSO); Glycerin; Na_2 -Fumarat; L-Aspartat; Na_3 -Citrat; L-Malat; Maleinat; Na_2 -Succinat; 3-Nitropropionat

Der pH-Wert der Effektoren wurde auf pH 7 eingestellt.

LB-Agar

LB-Medium mit 15 g/l Agar

Kanamycin-Ampicillin-X-Gal-IPTG-LB-Agar (KAXI-Agar)

LB-Agar

Nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben:

50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin; 25 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin; 0,5 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG); 20 $\mu\text{g/ml}$ 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)

Maltose-Ampicillin-Agar

H_2O mit 6,5 g/l Agar-Agar

Nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben:

100 ml/l 10 x M9-Medium; 0,4% (w/v) Maltose

SOC-Medium (Hanahan 1983)

20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,584 g/l NaCl; 0,19 g/l KCl; 2,03 g/l MgCl₂ x 6 H₂O; 2,46 g/l MgSO₄ x 7 H₂O; 3,96 g/l Glucose x H₂O

Es wurde zudem eine SOB-Fertigmischung (AE27.1, Roth) verwendet, der nur noch Glucose hinzugegeben wurde.

Glycerin-MOPS

1 mM MOPS; 15% Glycerin

TSB-Medium

100 g/l Polyethylenglycol (PEG 6000); 2,46 g/l MgSO₄ x 7 H₂O; 2,03 g/l MgCl₂ x 6 H₂O; 100 ml/l Dimethylsulfoxid

Induktoren (Stammlösungen)

1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)

1 M L(+)-Arabinose

Tab. M9: Verwendete Antibiotika und deren Konzentrationen

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml bzw. 200 µg/ml ^a
Chloramphenicol	20 mg/ml in Ethanol	20 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Streptomycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Tetracyclin	15 mg/ml in Ethanol:H ₂ O (1:1)	5 µg/ml

^a Bei GALLEX-Messungen wurde eine Endkonzentration von 200 µg/ml verwendet.

10 x PBS-Puffer (pH 7,5)

1,37 M NaCl; 0,027 M KCl; 0,1 M Na₂HPO₄; 0,02 M KH₂PO₄

Puffer und Lösungen für β -Galactosidase Tests (Miller 1992)

β -Galactosidase Reaktionspuffer (pH 7)

100 mM Kaliumphosphat-Puffer; 10 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 2,7 ml/l 2-Mercaptoethanol

Lösungen für den β -Galactosidasetest

4 mg/ml o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG)

1 M Na₂CO₃

Chloroform oder 0,1% Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS)

Puffer und Lösungen für Transportmessungen

Transportpuffer (pH 7)

100 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer; 1 mM MgSO₄

Lösungen

0,1 M LiCl

Rotizint ecoplus (Roth)

[2,3-¹⁴C]-Fumarat (33,3 Bq/nmol; Hartmann Analytic)

[2,3-¹⁴C]-Succinat (33,3 Bq/nmol; Moravec Biochemicals)

Kompetitoren für die Succinataufnahme

Na₂Fumarat; L-Aspartat; Na₃-Citrat; L-Malat; Maleinat; Na₂-Succinat; 3-Nitropropionat

Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Trenngel (12%)

8 ml Acrylamid-Mix (30% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid); 6,5 ml H₂O; 5 ml Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)/HCl (1,5 M; pH 8,8); 0,2 ml SDS (10% (w/v)); 0,02 ml Tetramethylethyldiamin (TEMED); 0,2 ml Ammoniumperoxodisulfat (APS; 10%)

Sammelgel (4%)

1,9 ml Acrylamid-Mix (30% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid); 4,7 ml H₂O; 2,1 ml Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8); 0,081 ml SDS (10% (w/v)); 0,022 ml TEMED; 0,033 ml APS (10%)

Laufpuffer (10 x)

250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1% (w/v) SDS

SDS-Probenpuffer (2 x)

100 mM Tris/HCl (pH 6,8); 200 mM Dithiothreitol (DTT); 4% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 20% (v/v) Glycerin

SDS-Proteinfärbung

0,5% Coomassie brilliant blue; 10% (v/v) Eisessig; 50% (v/v) Ethanol

Puffer und Lösungen für „semi-dry“ Western-Blotting (Towbin et al. 1979)

Transferpuffer

25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Ethanol (v/v)

Westernblot Proteinfärbung

5% (v/v) Trichloressigsäure; 2% (w/v) Ponceau S

Immunfärbung

Blockingpuffer

5% (w/v) Magermilchpulver & 0,1% (v/v) Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20) in 1 x PBS

Waschpuffer

0,1% (v/v) Tween 20 verdünnt in 1 x PBS

Antikörperlösung

3% (w/v) „bovine serum albumin“ (BSA) & 0,1% (v/v) Tween 20 in 1x PBS zuzüglich Antikörper

Primärantikörper

Penta-His-Antikörper, aus Maus (Qiagen) Verdünnung 1:5000-1:20000

DcuS-PAS_p-Antiserum, aus Kaninchen (Eurogentec) Verdünnung 1:2000-1:20000

Anti-MBP-Antiserum, aus Kaninchen (New England Biolabs); Verdünnung 1:2000

Sekundärantikörper

Anti-IgG gegen Maus, HRP-gekoppelt (Qiagen) Verdünnung 1:5000-1:20000

Anti-IgG gegen Kaninchen, HRP-gekoppelt (Sigma-Aldrich) Verdünnung 1:1000-1:20000

Nachweisreaktion

Chloronaphthol-Färbung: 30 mg 4-Chlor-1-naphthol in 20 ml Ethanol; 80 ml 0,1 M Tris/HCl (pH 7,6); 50 µl H₂O₂ (30%)

Chemilumineszenz: Immobilon Western HRP Substrat (Millipore)

Puffer für die Isolierung von Membranen

Puffer 1

50 mM Tris/HCl (pH 7,7); 10 mM MgCl₂

3.2.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung der *E. coli* Stämme erfolgte in Gegenwart der entsprechenden Antibiotika (Tab. M9). Bei der Verwendung von mehreren Antibiotika wurden deren Konzentrationen halbiert. Die verwendeten Plasmide wurden wie beschrieben induziert.

Genetisches Arbeiten

Die Kulturen für die molekulargenetischen Arbeiten wurden über Nacht aerob in Reagenzgläsern mit 5 ml LB bei 37°C gezüchtet (Excella E24, New Brunswick Scientific).

Elektrokompetente Zellen

Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurden Übernachtskulturen mit 5 ml LB und den adäquaten Antibiotika bei 37°C auf dem Inkubator geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die LB-Hauptkulturen mit 1 - 2% Inokulum angeimpft und in Erlenmeyerkolben mit Schikanen auf dem Schüttler bei 37°C kultiviert. Die Inkubation erfolgte bis zu einer optischen Dichte von 0,5 - 0,7 bei 578_{nm} (OD_{578nm}).

Hitzekompetente Zellen

Hauptkulturen der *E. coli* Stämme XL1-Blue sowie XL10-Gold wurden 2%ig mit Übernachtskulturen inokuliert und aerob in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bis zu einer OD_{578nm} von 0,4 - 0,5 gezüchtet.

Reportergergemessungen

Die Stämme für die *dcuB-lacZ* Reportergergestudien wurden in eM9 in Gegenwart oder Abwesenheit von Effektoren bei 37°C gezüchtet. Als Kohlenstoff- und Energiequelle diente Glycerin (50 mM) und als Elektronenakzeptor wurde DMSO (20 mM) verwendet. Die

Inkubation der Vorkulturen erfolgte semianaerob in Reagenzgläsern (5 ml) oder Deep-Wellplatten (1 ml pro Well) für 24 Stunden im Trockenschrank. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Hauptkulturen 1 – 15%ig angeimpft und für 18 - 29 Stunden anaerob bis zu einer OD_{578nm} von 0,4 - 0,9 (Photometer: U-1100 Spectrophotometer, HITACHI) oder einer OD_{570nm} von 0,3 - 0,6 (96-Well-Reader: EL808, Biotek; 315 μ l pro Well) gezüchtet. Die Evakuierung der anaeroben Sovirell-Röhrchen (5 ml) oder der Deep-Wellplatten (1 ml pro Well) erfolgte dreimal 5 Minuten bzw. 15 Minuten im Anaerobentopf und anschließend wurden die Gefäße mit Stickstoff (Reinheit >99,999%, Westfalengas) begast.

Wachstumsexperimente

Aerobe Wachstumsversuche von *E. coli* Stämmen wurden in eM9 in Anwesenheit einer einzigen Kohlenstoffquelle (50 mM) durchgeführt. Die Kulturen wurden in Reagenzgläsern mit einer Kolonie angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach regelmäßigen Abständen wurde die OD_{570nm} der Kulturen in 96-Well-Platten mit 250 μ l pro Well bestimmt (96-Well-Reader: EL808, Biotek). Bei hohen Zelldichten ($OD_{570nm} > 0,4$) wurden die Proben vor der Messung verdünnt.

Transportmessungen

Für die Aufnahmemessungen der DctA-Varianten wurden die Stämme unter aeroben Bedingungen in Reagenzgläsern mit 5 ml LB im Schüttelinkubator bei 37°C gezüchtet. Die Hauptkulturen wurden mit 2% Übernachtskulturen angeimpft und bis zu einer OD_{578nm} von 1,0 - 1,3 inkubiert. Bei den Kompetitionsmessungen wuchsen die Kulturen aerob in eM9 mit Succinat als Wachstumssubstrat. Die Hauptkulturen wurden 2%ig angeimpft und bis zu einer OD_{578nm} von 0,8 inkubiert.

BACTH-Interaktionsmessungen

Der Reporterstamm BTH101 wurde mit den Plasmiden der T18- und T25-Fusionen kotransformiert und auf KAXI-Platten ausplattiert. Diese Platten wurden dann für 40 Stunden aerob bei 30°C inkubiert. Die Kultivierung der Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium mit den Zusätzen Ampicillin, Kanamycin und IPTG (0,5 mM) bei 30°C. Jede Vorkultur wurde mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und aerob über Nacht im Schüttler kultiviert. Am

darauffolgenden Tag wurden die Hauptkulturen mit 2% der Übernachtskulturen inokuliert und bis in die exponentielle Wachstumsphase gezüchtet (Photometer (U-1100 Spectrophotometer, HITACHI): OD_{578nm} : 0,4 - 0,9; 96-Well-Reader (EL808, Biotek): OD_{570nm} : 0,27 – 0,58). Die Vorkulturen und Hauptkulturen wurden entweder in Reagenzgläsern (5 ml) oder in 48-Well-Platten (0,65 ml pro Well) angesetzt und in den jeweiligen Schüttlern (Reagenzgläser: Excella E24, New Brunswick Scientific; 48-Well-Platten: Titramax 1000, Heidolph) inkubiert.

GALLEX-Dimerisierungsstudien

Bei den GALLEX-Messungen wurden die Kulturen aerob in LB-Medium mit Ampicillin und IPTG (5 μ M) bei 30 °C inkubiert. Die Plasmide mit den GALLEX-Konstrukten wurden in Stamm SU101 transformiert und auf Agar-Platten gezüchtet. Am darauffolgenden Tag wurden Vorkulturen in Reagenzgläsern (5ml) mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht kultiviert. Die Hauptkulturen (5ml) wurden 2%ig mit diesen Übernachtskulturen inokuliert und bis zu einer OD_{578nm} von 0,6 auf dem Schüttler (Excella E24, New Brunswick Scientific) inkubiert.

Einbau und Orientierung der GALLEX-Konstrukte

Der MBP-defekte Stamm NT326 wurde mit den Plasmiden der GALLEX-Konstrukte transformiert und auf eM9-Platten mit Maltose (0,4%) als einziger Kohlenstoffquelle ausgestrichen. Die Platten wurden für 2 - 3 Tage bei 37°C im Trockenschrank inkubiert.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Für die Lokalisierungsstudien wurden die Expressionsplasmide der YFP-Fusionen in die entsprechenden *E. coli* Stämme transformiert und aerob in LB-Medium mit den adäquaten Antibiotika bei 30°C gezüchtet. Einerseits wurden Hauptkulturen 2%ig mit Übernachtskulturen angeimpft und bis OD_{578nm} 0,7 - 0,9 gezüchtet. Dabei erfolgte die Induktion der YFP-Fusionen von Beginn an mit L-Arabinose (133 μ M). Andererseits wurden die Hauptkulturen bis in die exponentielle Wachstumsphase kultiviert und anschließend wurden die YFP-Konstrukte durch L-Arabinose (50-333 μ M) für 1-3 Stunden induziert.

3.3 Molekulargenetische Methoden

Die molekulargenetischen Techniken Polymerase-Kettenreaktion, Restriktionsverdau und Ligation von Desoxyribonukleinsäuren wurde gemäß Standardprozeduren nach Sambrook & Russell (2001) durchgeführt. Für die Isolierung von Plasmiden wurden das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) sowie das GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) verwendet. Genomische DNA wurde mit dem Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) isoliert. Der Verdau von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firma Thermo Scientific. Restringierte DNA-Fragmente sowie PCR-Produkte wurden mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) und dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) gereinigt. Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das GeneJET Gel Extraction Kit benutzt. Bei der Insertion von DNA-Fragmenten in Plasmide wurde die restringierte Vektor-DNA mit der alkalischen Phosphatase (FastAP, Thermo Scientific) dephosphoryliert und mit den gewünschten DNA-Fragmenten durch die T4-Ligase (Thermo Scientific) ligiert. Die Ligationsansätze wurden nach einer Hitzeinaktivierung der T4-Ligase direkt in elektrokompente Zellen von *E. coli* transformiert. Mit Ausnahme der gerichteten Mutagenese erfolgten die Transformationen in dieser Arbeit mittels Elektroporation (Dower et al. 1988).

Die Punktmutationen und die Sequenz der konstruierten Plasmide wurden durch Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin; StarSEQ, Mainz) verifiziert.

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al. 1986)

Gewünschte DNA-Abschnitte wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Für die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde hauptsächlich die Phusion DNA-Polymerase (Thermo Scientific) verwendet. Lediglich bei der Amplifikation der Transmembrandomänen für die GALLEX-Konstrukte und bei der ungerichteten Mutagenese kam die *Taq*-Polymerase (Thermo Scientific) zur Anwendung. Diese besitzt keine Korrekturlesefunktion. In Tabellen M10 und M11 sind die Bestandteile der PCR-Ansätze und die PCR-Protokolle der Phusion und *Taq*-Polymerase zusammengefasst. Die Primer für die PCRs wurden von MWG Biotech oder Sigma-Aldrich synthetisiert und die Reaktionen wurden in den Thermocyclern iCycler (Bio-Rad), MyCycler (Bio-Rad) oder MJ Mini-Cycler (Bio-Rad) durchgeführt.

Tab. M10: Endkonzentrationen der Komponenten eines 50 µl PCR-Ansatzes der verwendeten Polymerasen.

Komponenten	Phusion (Thermo Scientific)	Taq (Thermo Scientific)
PCR-Puffer	10 µl HF-Puffer (5 x)	5 µl Taq-Puffer (10 x)
dNTP Mix (10 mM)	jeweils 250 µM	jeweils 250 µM
MgCl ₂	im Puffer enthalten	1,5 - 3 mM
Primer	jeweils 0,5 µM	jeweils 0,5 µM
Template DNA	10 - 200 ng	50 - 100 ng
Polymerase	1 U	1 U
DMSO	-	0 - 10%
destilliertes H ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl

Tab. M11: PCR-Protokolle der verwendeten Polymerasen.

Schritt	Phusion (Thermo Scientific)	Taq (Thermo Scientific)
(I) Initiale Denaturierung	98°C, 30 sec	95°C, 3 min
(II) Denaturierung*	98°C, 20 sec	95°C, 30 sec
(III) Annealing*	T _m + 3°C, 30 sec ^a	T _m - 5°C, 30 sec
(IV) Elongation*	72°C, 15-30 sec/kb	72°C, 1 min/kb
(V) Finale Elongation	72°C, 10 min	72°C, 10 min

* Schritte (II) – (IV) wurden 20-40 wiederholt.

^a Bei der gerichteten Mutagenese erfolge das Annealing der Primer immer bei 58°C.

3.3.2 Gerichtete Mutagenese

Gerichtete Mutagenese wurde analog zum QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. Dabei wurden die Punktmutationen durch eine PCR mit Mutageneseprimern und der Phusion DNA-Polymerase erstellt und die PCR-Produkte nach einem Restriktionsverdau mit *DpnI* in hitzekompetente Zellen XL1-Blue oder XL10-Gold Zellen (Stratagene) transformiert. Zur Herstellung der hitzekompetenten Zellen wurden die Stämme XL1-Blue und XL10-Gold nach Kultivierung bis zu einer OD_{578nm} von 0,4-0,5 geerntet. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis gekühlt und jeweils 20 ml Kultur wurde in 1 ml TSB-Medium aufgenommen. Diese Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseprimer sind in Tabelle M3 aufgeführt.

3.3.3 Ungerichtete Mutagenese von DctA

Die ungerichtete Mutagenese erfolgte gemäß der „error-prone PCR“ (Cadwell & Joyce 1992). Vom Plasmid pMW2156 wurden mit dem Primerpaar pMW1194_EcoRV(C-Term)_for/pMW457_Random_rev die letzten 309 Basenpaare von DctA vervielfältigt. Dabei wurden die

PCR-Bedingungen so gewählt, dass bei der Amplifikation der DctA-Fragmente Mutationen entstanden. So lagen die Komponenten *Taq*-Polymerase (5 - 10 U) und $MgCl_2$ (4 - 8 mM) im Überschuss vor und die PCR wurde mit einer erhöhten Zyklenanzahl (>30) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRV* und *XhoI* verdaut und mit dem, ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen und dephosphorylierten, Vektor pMW2156 ligiert. Im Anschluss wurden die ligierten Plasmide, bei denen DctA unter der Kontrolle des nativen Promotors steht, in Stamm IMW386 (Kleefeld 2002) transformiert und auf eM9-Platten mit 50 mM Glycerin und variierenden X-Gal Konzentrationen ausplattiert. Dieser *E. coli* Stamm besitzt eine DctA-Defizienz sowie das Reportergen *dctA-lacZ*. Diese Reporterfusion sollte zum Blau-Weiß-Screening für regulatorisch-defiziente DctA-Varianten verwendet werden.

3.3.4 Konstruktion von Plasmiden

Alle erstellten Plasmide wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Mutationen der Plasmide sowie zusätzliche Restriktionsschnittstellen wurden durch gerichtete Mutagenese der Ursprungsvektoren erstellt. Die Primer, die für die Konstruktion der Plasmide benötigt wurden, sind in Tabellen M5 - M7 angegeben.

GALLEX-Konstrukte

Die PCR-Primer für die Amplifikationen der TM1- und TM2-Fragmente von DcuS mit variierenden Längen sind in Tabelle M5 aufgelistet. Als Template für die PCRs diente Plasmid pMW181 (Janausch et al. 2002b) bzw. dessen Derivate für die entsprechenden TM-Varianten. Es wurden für TM1 Abschnitte von 51 (Primerpaar $TM1_{DcuS[17]}$: TM1for(17)1/GALLEX-TM1v-17-rev) sowie 48 (Primerpaar $TM1_{DcuS[16]}$: TM1for(16)/TM1rev(16)) Basenpaaren (Bp) vervielfältigt. Die TM2-Fragmente bestanden aus 60 (Primerpaar $TM2_{DcuS[20]}$: G-TM2_compl-for/G-TM2_compl-rev), 51 (Primerpaar $TM2_{DcuS[17]}$: TM2for(17)2/TM2rev(17)2) und 48 (Primerpaar $TM2_{DcuS[16]}$: G-TM2_compl-for/TM2_17_rev) Bp. Für die PCRs wurden die *Taq*-Polymerase verwendet, da mit der Phusion DNA-Polymerase keine Produkte erhalten wurden. Im Anschluss an die PCR wurden die DNA-Fragmente der Transmembranhelices von DcuS mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *SpeI* verdaut und über diese Restriktionsschnittstellen in das pBR322-Derivat pBLM100

(Schneider & Engelman 2003) eingefügt. Als Beispiel für die resultierenden Vektoren ist pMW1967, der ein Fragment von TM1 mit 17 Aminosäuren beinhaltet, schematisch in Abbildung M1 dargestellt. Die konstruierten pBLM100-Derivate besitzen eine Ampicillin-Resistenz und die GALLEX-Konstrukte mit N-terminalen *lexA*- und C-terminalen *malE*-Fusionen stehen unter der Kontrolle des *tac*-Promotors.

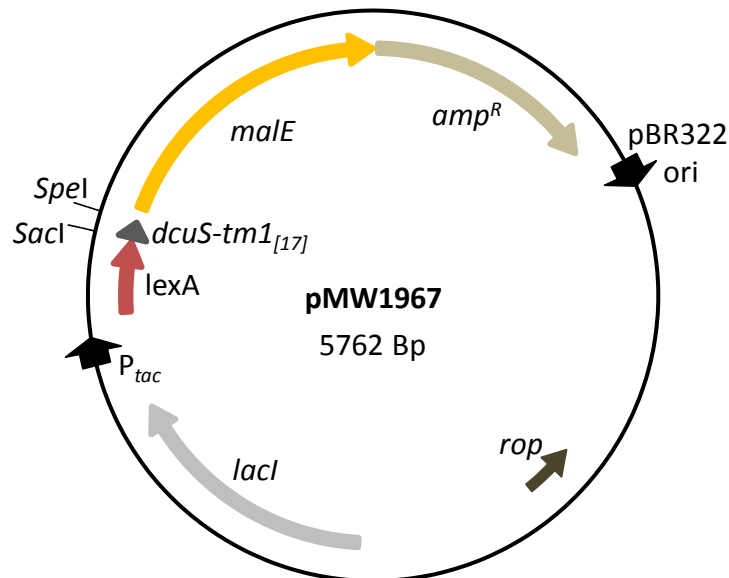


Abb. M1: Schematische Darstellung des GALLEX-Plasmids pMW1967. Dieses pBLM100-Derivat kodiert für das GALLEX-Konstrukt *lexA-dcuS-tm1_[17]-malE*.

DcuR-Plasmide

Aufgrund der Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzen des Reportergenstammes IMW238 (Zientz et al. 1998) mussten die *yfp*-Fusionen von *dcuR* im pBAD30-Derivat pMW643 erstellt werden. Dieser Expressionsvektor besitzt neben einer Ampicillin- zusätzlich eine Tetracyclin-Resistenz und weist einen L-Arabinose-induzierbaren Promotor auf. Die Insertion der *dcuR*-Fusionen erfolgte stets ungerichtet über *XbaI*-Schnittstellen. Nach Restriktionsverdau konnten Klone mit der richtigen Orientierung von *dcuR* identifiziert werden und anschließend durch Sequenzierung bestätigt werden.

Für Plasmid pMW1739 konnte die Fusion von *dcuR-yfp* aus dem bereits bestehenden Plasmid pMW1081 (Scheu unveröffentlicht) durch den Restriktionsverdau mit *XbaI* gewonnen werden und nach anschließender Gelextraktion in den Vektor pMW643 integriert werden.

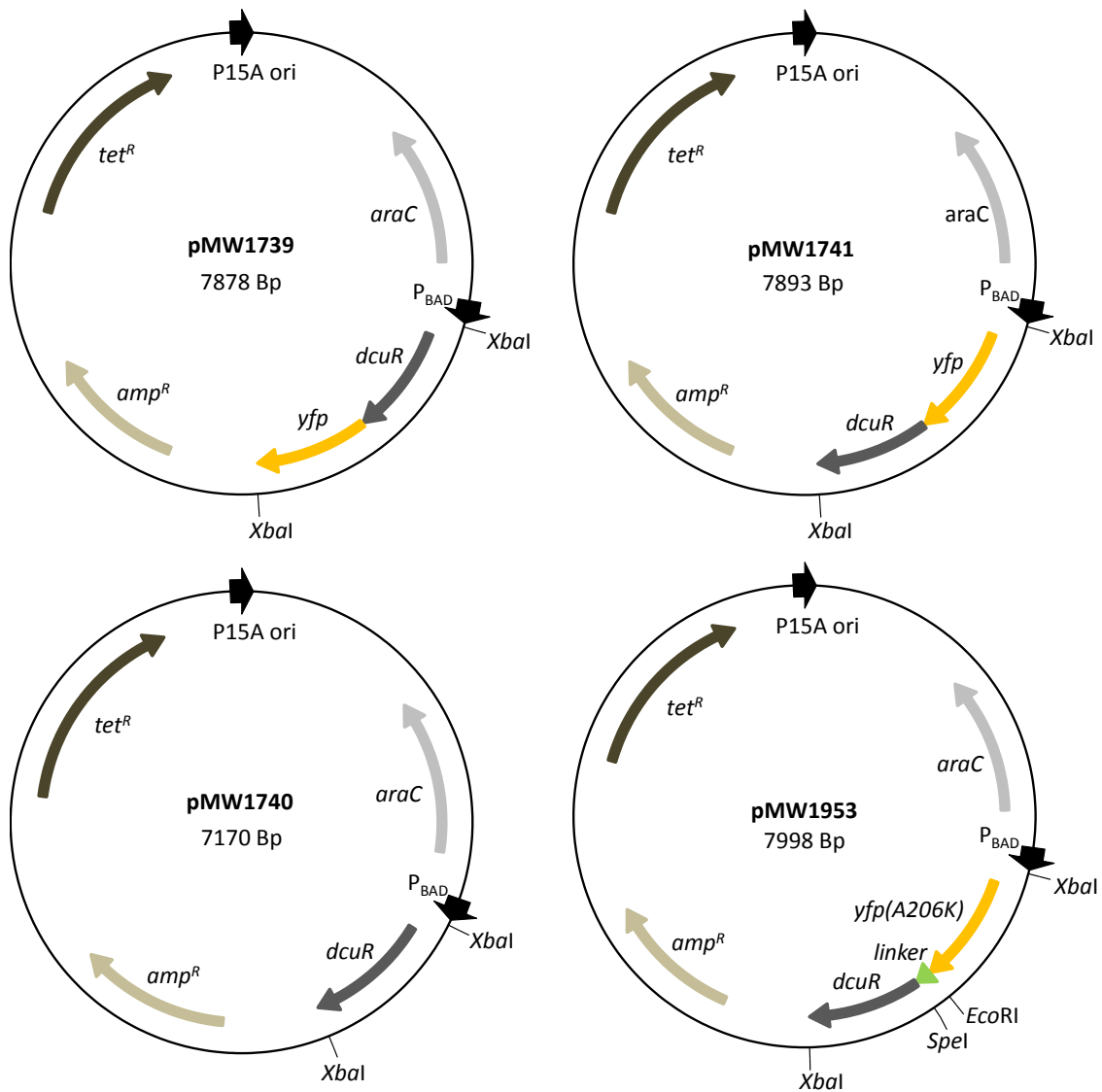


Abb. M2: DcuR Expressionsvektoren für die Lokalisierungsstudien. Wildtypisches *dcuR* sowie die Fusionen mit *yfp* wurden über *XbaI*-Schnittstellen in pMW643 integriert. In den resultierenden pMW643-Derivaten pMW1739, pMW1740, pMW1741 und pMW1953 stehen die DcuR-Konstrukte unter der Kontrolle des P_{BAD}-Promotors und können durch L-Arabinose induziert werden.

Das *dcuR* Gen für das *yfp-dcuR* Konstrukt wurde aus pMW266 durch *HindIII* und einer eingefügten N-terminalen *EcoRI*-Schnittstelle (*dcuR_n-T_EcoRIfor/dcuR_n-T_EcoRIrev*) in Plasmid pMW392 (Scheu et al. 2008) eingebracht. Der resultierende Vektor pMW1742 beinhaltet die gewünschte Fusion von *yfp-dcuR*. Zusätzlich wurde zwischen die *EcoRI*-Schnittstelle und *dcuR* eine *SpeI*-Schnittstelle (*YFP-SpeI-DcuR-for/YFP-SpeI-DcuR-rev*) eingefügt, um zwischen die Fusionskomponenten einen Linker integrieren zu können. Die 5'-phosphorylierten Oligonukleotide Linker-for und Linker-rev wurden hybridisiert und in den Vektor pMW1742 über die Schnittstellen *EcoRI* und *SpeI* eingebracht. Die Fusionen *yfp-dcuR* und *yfp-linker-dcuR* wurden anhand der N-terminalen und einer zusätzlich erstellten C-

terminalen *Xba*I-Schnittstelle (*dcuR*-C-*Xba*I-for/*dcuR*-C-*Xba*I-rev) mit pMW643 zu pMW1741 bzw. pMW1951 ligiert.

Als Kontrolle für die Komplementationstests der YFP-Fusionen von DcuR wurde ebenfalls wildtypisches *dcuR* in das pBAD30-Derivat pMW643 eingefügt. Dafür wurde *dcuR* aus dem Plasmid pMW266 mittels einer zusätzlichen C-terminalen *Xba*I-Restriktionsschnittstelle (*dcuR*-C-*Xba*I-for/*dcuR*-C-*Xba*I-rev) in pMW643 kloniert. Im so konstruierten Plasmid pMW1740 steht wildtypisches *dcuR* unter der Kontrolle eines L-Arabinose-induzierbaren Promotors.

DauA-Fusionen

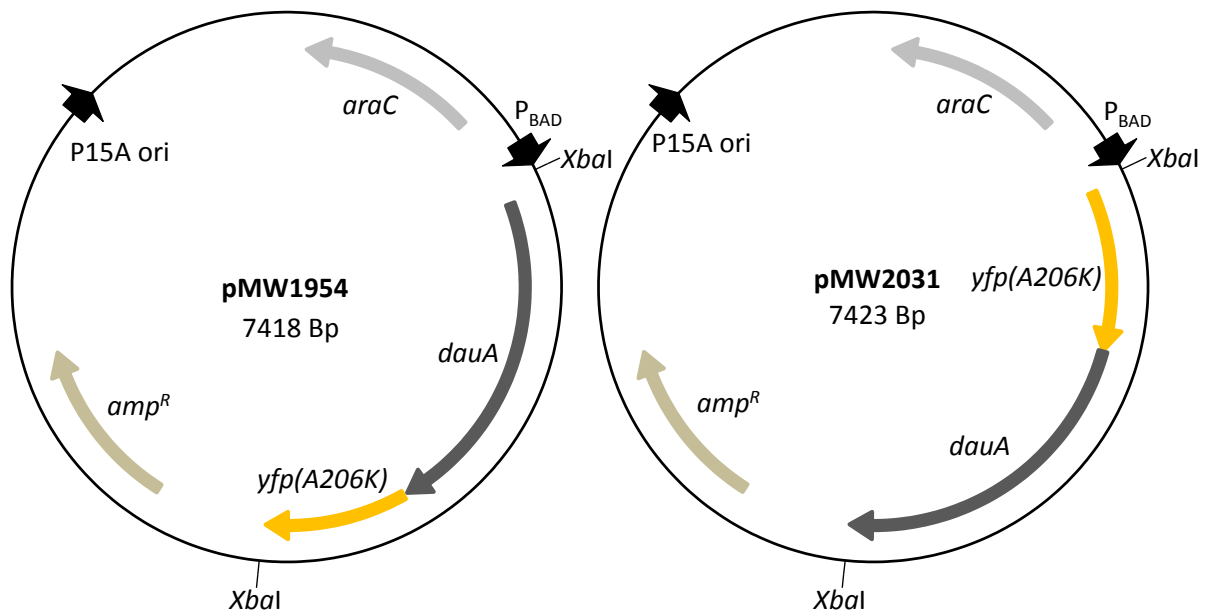


Abb. M3: Expressionsplasmide der YFP-Fusionen von DauA. Die pBAD30-Derivate pMW1954 und pMW2031 enthalten *dauA*-*yfp(A206K)* bzw. *yfp(A206K)*-*dauA*. Diese Fusionen wurden über *Xba*I eingefügt und werden durch den P_{BAD}-Promotor reguliert.

Das *dauA* Gen wurde aus dem Plasmid pArno für *dauA*-*yfp* mit dem Primerpaar *y*chM(C)for/*y*chM(C)rev und für *yfp*-*dauA* mit den Primern *y*chM(N)for/*y*chM(N)rev mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde bei *dauA*-*yfp* das Stoppcodon von *dauA* durch den Primer *y*chM(C)rev entfernt. Die PCR-Produkte wurden anschließend anhand der Restriktionsschnittstellen *Nde*I/*Bam*HI bzw. *Hind*III/*Xho*I in die pET28a-Derivate pMW391 und pMW392 eingefügt und durch gerichtete Mutagenese wurde die monomere Variante

von YFP(A206K) erstellt. Die Fusionen *dauA-yfp(A206K)* und *yfp(A206K)-dauA* der resultierenden Plasmide pMW1900 und pMW1901 wurden mittels zusätzlicher *Xba*-Schnittstellen (Yfp(N)for/Yfp(N)rev; Yfp(C)for/Yfp(C)rev) in den Expressionsvektor pBAD30 kloniert. Durch die P_{BAD} -Promotoren der Plasmide pMW1954 und pMW2031 kann die Expression von *dauA-yfp(A206K)* und *yfp(A206K)-dauA* sehr präzise durch L-Arabinose gesteuert werden.

3.3.5 Das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System (Karimova et al. 1998)

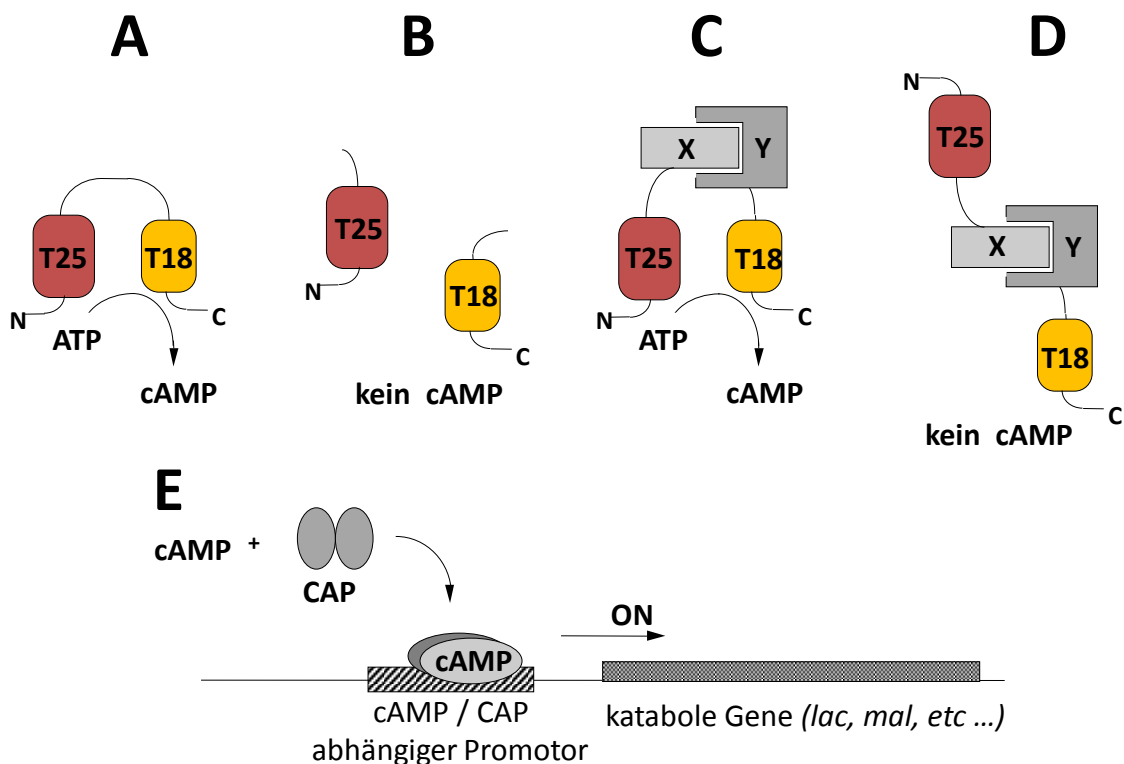


Abb. M4: Schema der Funktionsweise des BACTH-Systems. (geändert nach Karimova et al. 1998)

Das BACTH-System ermöglicht *in vivo* Protein-Protein-Interaktionsmessungen durch eine funktionale Rekonstitution der Adenylatcyclase-Defizienz des *E. coli* Stammes BTH101 mit der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis*. Die katalytische Domäne dieser setzt sich aus den Domänen T18 und T25 zusammen. Im wildtypischen Protein befinden sich beide Domänen in räumlicher Nachbarschaft und katalysieren die Reaktion von ATP zu cAMP (Abb. M4A). Trennt man T18 und T25 voneinander, geht die Adenylatcyclaseaktivität verloren (Abb. M4B). Durch Fusionen mit interagierenden Proteinen (X; Y) kann die katalytische

Funktion von T18 und T25 wieder hergestellt werden, falls durch die Interaktion die beiden Domänen in räumliche Nähe zueinander gelangen (Abb. M4C). Neben fehlender Interaktion der T18- und T25-Fusionen können aber auch sterische Effekte für die Inaktivität von T18 und T25 verantwortlich sein (Abb. M4D). Im Reporterstamm BTH101 kann demnach die Interaktion von zwei Proteinen durch Fusionen mit T18 und T25 anhand der Synthese von cAMP gemessen werden (Abb. M4E). Das „catabolite activator protein“ (CAP) wird durch cAMP aktiviert und induziert unter anderem die Expression des *lac*-Operons. Diese Induktion kann dann anhand der β -Galactosidaseaktivität bestimmt werden und dient als Maß für die Protein-Protein-Wechselwirkung.

3.3.6 GALLEX-System (Schneider & Engelman 2003)

Das GALLEX-System ermöglicht Messungen zur Dimerisierung einer einzelnen Transmembranhelix oder zwei unterschiedlicher Transmembrandomänen. Dabei beruht diese Methode auf der Repression des *lacZ* Gens durch Varianten der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors LexA in Reporterstämmen. Diese Expressionshemmung kann anhand der Aktivität der β -Galactosidase ermittelt werden. Um die Wechselwirkungen zwischen den TMs zu bestimmen, werden Chimäreproteine aus einer N-terminalen LexA-DNA-Bindedomäne, der zu untersuchenden Helix und einem C-terminalen Maltose-Bindeprotein erstellt. Die Konstruktion dieser Fusionen erfolgt mit dem pACYC-Derivat pALM148 und dem Vektor pBLM100, der aus pBR322 hervorgeht. Im Reporterstamm SU101 (Dmitrova et al. 1998) können die pBLM100-Derivate auf Homodimerisierung (Abb. M5A) untersucht werden. In diesem Stamm wird die Expression von *lacZ* durch den *sulA* Operator (op+/op+) reguliert. Durch die Homodimerisierung der Transmembrandomänen der GALLEX-Konstrukte bilden sich LexA-Homodimere, die an diesen Operatorbereich binden und die Expression von *lacZ* reprimieren. Die Bestimmung der Heterodimerisierung von zwei unterschiedlichen TMs erfolgt in SU202 (Dmitrova et al. 1998) (Abb. M5B). Dabei besitzen die GALLEX-Konstrukte der beiden TMs unterschiedliche LexA-Varianten. Die pALM148-Derivate produzieren Chimäreproteine mit LexA408, die einen modifizierten Operator (op408) erkennen, und die Fusionen der pBLM100-Derivate bilden wildtypisches LexA. Bei Heterodimerisierung der GALLEX-Konstrukte in SU202 können die geformten LexA408/LexA-Heterodimere an den Hybrid-Operator (op408/op+) binden und damit die Expression von

lacZ inhibieren. Die Repression von *lacZ* kann anhand der β -Galactosidaseaktivität bestimmt werden und gilt als Maß für die Interaktion zwischen den Transmembrandomänen.

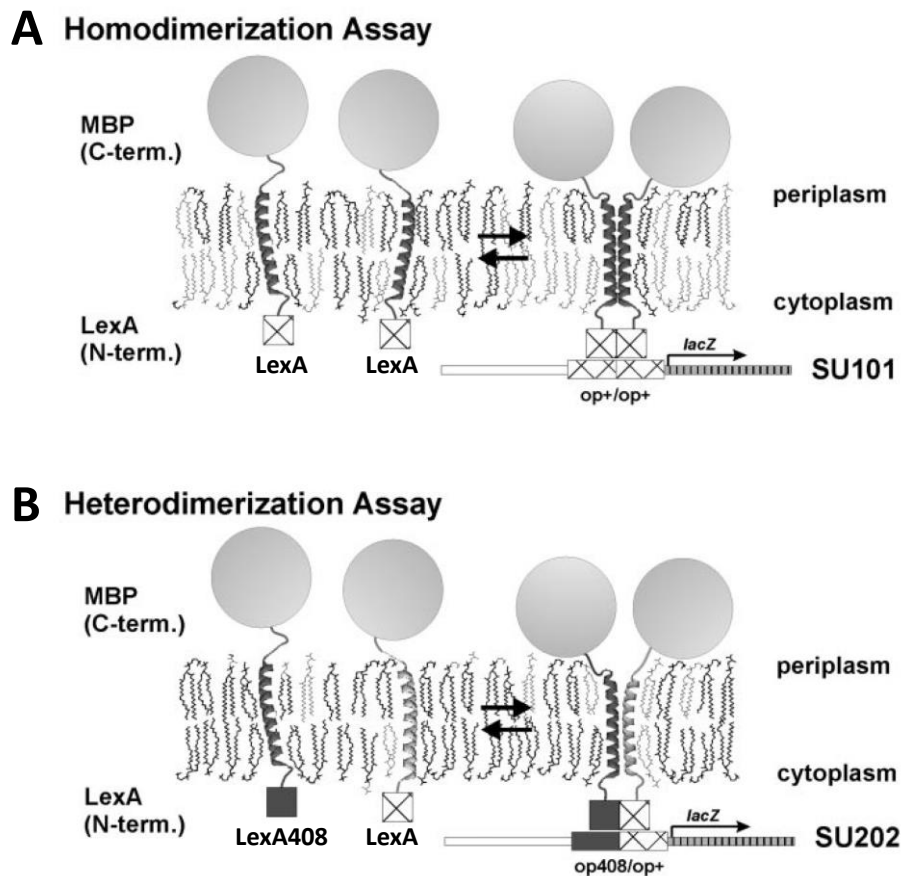


Abb. M5: Schema der Homo- (A) und Heterodimerisierung (B) im GALLEX-System. (geändert nach Schneider & Engelman 2004)

3.3.7 Modifiziertes BACTH-System (Steindorf unveröffentlicht)

Die Heterodimerisierung von antiparallelen Transmembrandomänen kann mit einem modifizierten BACTH-System bestimmt werden (Steindorf unveröffentlicht). In diesem System werden die Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen analog zum BACTH-System (Karimova et al. 1998) anhand der Rekonstitution der *cyd*-Defizienz von BTH101 durch Fusionen der Domänen T18 und T25 gemessen. Die gewünschten TMs werden an einem Ende mit T18 oder T25 gekoppelt und am entgegengesetzten Terminus mit dem Maltose-Bindeprotein fusioniert. Zur Konstruktion von Chimären mit N-terminalen T18 oder T25 dienen die Plasmide pALT18ii (T18) und pBLT25ii (T25). Für C-terminale Fusionen der Domänen der Adenylatcyclase werden die Vektoren pAMT18ii (T18) und pBLM25ii (T25) verwendet. Kommt es zur Interaktion zwischen den TMs dieser Fusionskonstrukte, können die Domänen T18 und T25 ihre katalytische Funktion zurück erlangen und ATP zu cAMP

umsetzen (Abb. M6). Die erhöhten cAMP-Konzentrationen aktivieren CAP, welches dann als Transkriptionsfaktor unter anderem die Transkription von *lacZ* steigert. Die Expression von *lacZ* kann anhand der β -Galactosidaseaktivität bestimmt werden und gilt als Maß für die Interaktion der TMs.

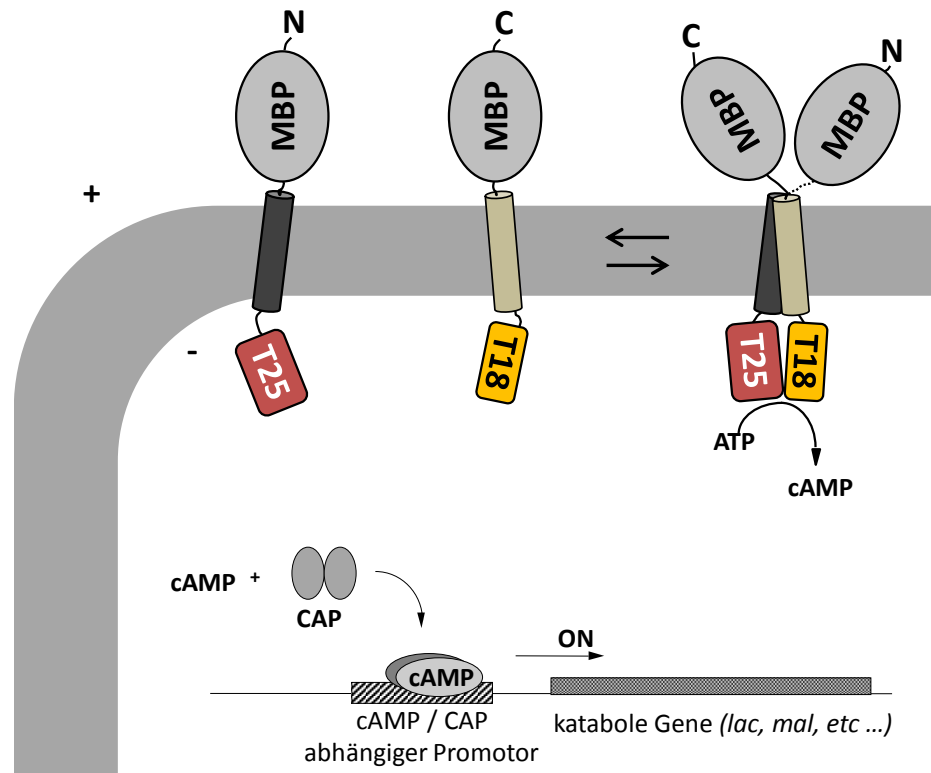


Abb. M6: Schematische Darstellung der Heterodimerisierung von Fusionskonstrukten mit antiparallelen Transmembrandomänen im modifizierten BACTH-System (Steindorf unveröffentlicht).

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Qualitative und quantitative Bestimmung der β -Galactosidase

Die qualitativen Screenings zu den Expressionsuntersuchungen der ungerichteten Mutagenese von DctA sowie den Interaktionsstudien im BACTH-System erfolgten auf Agarplatten mit dem chromogenen Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal). Dieses wird von der β -Galactosidase in Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Letzteres wird in Anwesenheit von Sauerstoff in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo umgewandelt. Als weiteres Substrat für die qualitativen Expressionsstudien der ungerichteten Mutagenese wurde das fluoreszierende Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid (MUG) verwendet. Bei dessen Spaltung durch die

β -Galactosidase entsteht das 4-Methylumbelliferon, welches bei 445 nm nach Anregung bei 365 nm nachgewiesen werden kann.

Die quantitativen β -Galactosidasetests für die *dcuB-lacZ* Expressionsstudien, die BACTH- sowie GALLEX-Interaktionsmessungen wurden nach den Angaben von Miller (1992) mit dem chromogenen Substrat o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) durchgeführt. Bei der Hydrolyse von ONPG durch die β -Galactosidase entstehen die Produkte Galactose und ortho-Nitrophenol. Letzteres kann photometrisch bei 420 nm nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit fanden zwei unterschiedliche Varianten des β -Galactosidasetests Anwendung. Der Test wurde einerseits in Reagenzgläsern mit anschließender Bestimmung im Photometer (U-1100 Spectrophotometer, HITACHI) durchgeführt oder andererseits in Mikrotiterplatten (MTP) die im MTP-Reader (EL808, Biotek) photometrisch ausgewertet wurden. Bei den Ergebnissen ist vermerkt, wenn das Mikrotiterplatten-Protokoll zum Einsatz kam. Ansonsten wurde der Test in Reagenzgläsern durchgeführt. Die β -Galactosidaseaktivitäten wurden jeweils von mindestens zwei parallelen Kulturen und von jeder dieser Kulturen in Vierfachbestimmung quantifiziert. Diese Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

β -Galactosidasetest in Reagenzgläsern

Bei diesem Protokoll wurden 0,2 ml der Kulturen, deren OD_{578nm} zuvor bestimmt wurde, zu 0,8 ml β -Galactosidase Reaktionspuffer gegeben und mit 30 μ l Chloroform und 25 μ l SDS (0,1%) in Reagenzgläsern durch 10-sekündiges Vortexen aufgeschlossen. Die Reagenzgläser wurden anschließend bei 28°C für 5 Minuten im Wasserbad inkubiert, bevor der Test mit 0,2 ml ONPG (4 mg/ml) gestartet wurde. Bei deutlicher Gelbfärbung oder nach 20 minütiger Inkubation bei 28°C wurde die Reaktion mit 0,5 ml Na_2CO_3 (1 M) gestoppt. Die Ansätze wurden danach in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 Minuten zentrifugiert (13000 rpm; Biofuge pico, Heraeus). Die Extinktion des Überstands wurde bei 420 nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke 10 mM; Typ 104-OS, Hellma Analytics) bestimmt.

β -Galactosidasetest in Mikrotiterplatten

Der Test in Mikrotiterplatten beruht auf einem modifizierten Protokoll nach (Griffith & Wolf 2002). Sowohl die Bestimmung der optischen Dichte der Kulturen vor Testbeginn als auch

die Extinktionsmessung zur Bestimmung des gebildeten ortho-Nitrophenols wurden in 96-Wellplatten im MTP-Reader (EL808, Biotek) durchgeführt. Der Zellaufschluss der Kulturen erfolgte in Deep-Wellplatten durch die Mischfunktion (30x) einer automatischen Mehrkanalpipette (Rainin, Mettler-Toledo). Dafür wurden pro Well 0,1 oder 0,2 ml Zellsuspension zu 0,9 bzw. 0,8 ml Reaktionspuffer gegeben und mit 50 µl CTAB (0,1%) und 25 µl SDS (0,1%) gemischt. Im Anschluss wurden aus jedem Well vier Aliquots mit je 185 µl des Reaktionsgemisch entnommen und in MTPs übertragen. Die MTPs wurden 5 Minuten bei 30°C vorgewärmt und der Test wurde durch 40 µl ONPG (4 mg/ml) pro Well gestartet. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei 30 °C wurde die Reaktion durch 90 µl Na₂CO₃ (1 M) gestoppt und die Extinktion der MTPs wurde im MTP-Reader bei 415 nm bestimmt.

Die Aktivität der β-Galactosidase in Miller Units (MU) wurde durch folgende Formel berechnet.

$$\beta - \text{Galactosidaseaktivität in Miller Units [MU]} = \frac{1000 \times \Delta E_{420} *}{t[\text{min}] \times V[\text{ml}] \times \Delta OD_{578} *}$$

ΔE₄₂₀: Extinktion der Probe bei 420 nm mit Abzug des Blindwertes; **t**: Zeit in Minuten; **V**: Volumen der Probe in ml; **ΔOD₅₇₈**: Differenz der OD der Kultur und der OD des Blindwertes bei 578 nm; *: beim Test in Mikrotiterplatten wurde die Extinktion bei 415 nm und die optische Dichte bei 570 nm bestimmt.

3.4.2 Transportmessungen

Vorbereitung der Kulturen

Die Stämme für die Aufnahmemessungen wurden nach aerober Kultivierung in LB bei einer OD_{578nm} von 1,0 - 1,3 geerntet (10000 x g; 20 min; 4°C; Eppendorf 5403) und anschließend fortwährend bei 4°C gekühlt. Die Pellets wurden einmal mit Transportpuffer gewaschen, erneut zentrifugiert und mit Transportpuffer auf eine OD_{578nm} von 5 eingestellt.

Die Kulturen für die Kompetitionsmessungen wurden aerob in eM9 mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle bis zu einer OD_{578nm} von 0,8 gezüchtet. Nach der Zellernte (10000 x g; 20

min; 4°C; Eppendorf 5403) wurden die Zellen ebenfalls bei 4°C gehalten. Die Zellen wurden mit Transportpuffer gewaschen und in diesem auf eine OD_{578nm} von 8 resuspendiert.

Vor Beginn der Messungen wurden alle Zellsuspensionen für 5 Minuten bei 37°C inkubiert.

Messung der Aufnahmekinetik

Zur Bestimmung der Aufnahmekinetiken wurden 640 µl Zellsuspension ($OD_{578nm} \sim 5$) zu 160 µl [2,3- ^{14}C]-Fumarat (100 µM; 250 µM; 500 µM) gegeben, die Ansätze wurden kurz durch Vortexen gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurden pro Ansatz 100 µl Zellsuspension mit 900 µl eiskaltem LiCl (0,1 M) gestoppt und auf Glasfaserfilter (APFF, Ø25 mm, Porengröße 0,7 µm, Millipore), die zuvor mit LiCl befeuchtet wurden, übertragen. Anschließend wurden die Proben vakuumfiltriert (FH 225V Ten Place filter manifold; Hoefer Pharmacia Biotech) und zweimal mit 1 ml LiCl (0,1 M) gewaschen. Danach wurden die Filter in Szintillationsvials (Roth oder Perkin Elmer) überführt und in 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth) aufgelöst.

Aufnahmemessungen

Die Aufnahmeaktivität der DctA-Varianten wurde bei 37°C getestet. Dafür wurden 30 µl [2,3- ^{14}C]-Fumarat (250 µM) mit 120 µl Zellsuspension ($OD_{578nm} \sim 5$) versetzt, gemischt und für eine Minute inkubiert. Die Reaktion wurde wie oben beschrieben gestoppt und auf die Filter übertragen. Die Aufnahmeaktivität der DctA-Varianten wurde als Doppelbestimmung in mindestens zwei parallelen Ansätzen durchgeführt.

Kompetitionsmessungen

Bei den Competitionsmessungen wurden 10 µl [2,3- ^{14}C]-Succinat (500 µM) mit 90 µl Zellkultur inklusive Kompetitor ($OD_{578nm} \sim 8$) versetzt, gemischt und bei 37°C inkubiert. Die Kompetitoren lagen im 10 - 400fachen Überschuss vor. Die Aufnahme der Zellen wurde nach 30 Sekunden wie bei der Aufnahmekinetik gestoppt und in den beschriebenen Schritten auf die Filter übertragen. Die Competitionversuche wurden als Doppelbestimmung in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt.

Bestimmung der Radioaktivität und Berechnung der Transportaktivität

Zur Bestimmung der Blindwerte für die unspezifische Aufnahme wurden die Zellsuspensionen direkt mit LiCl versetzt und anschließend erst [2,3-¹⁴C]-Fumarat bzw. [2,3-¹⁴C]-Succinat hinzugegeben. Die Radioaktivität der Proben in den Szintillationsvials wurde mit einem Flüssigszintillationszähler (1414 liquid scintillation counter, Wallac) in Zerfällen pro Minute (dpm) gemessen. Die Berechnung der Aufnahmeaktivität erfolgte gemäß der folgenden Formel mit der gemessenen Radioaktivität.

$$\text{Aufnahmeaktivität [U/gTG]} = \frac{\Delta\text{dpm} \times 10000}{\frac{\text{dpm}}{\text{nmol}} \times t[\text{min}] \times 281 \text{ mgTG} \times \Delta\text{OD}_{578}}$$

Δdpm: Radioaktivität der Probe mit Abzug des Blindwertes; **dpm/nmol:** Radioaktivität der verwendeten Lösungen der Substrate [2,3-¹⁴C]-Fumarat bzw. [2,3-¹⁴C]-Succinat pro nmol; **t:** Zeit nach dem die Aufnahme gestoppt wurde; **ΔOD₅₇₈:** Differenz der OD der Kultur und der OD des Blindwertes bei 578 nm; Eine OD₅₇₈ von 1 einer Kultur entspricht einem Zelltrockengewicht (TG) von 281 mg (Zientz et al. 1996)

3.4.3 Expressionsanalyse durch SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotting

Für die Expressionsuntersuchungen in dieser Arbeit wurden die Stämme entweder unter exprimierenden Wachstumsbedingungen gezüchtet oder sie wurden in LB kultiviert und die Proteine oder Fusionskonstrukte wurden durch IPTG oder L-Arabinose von Plasmiden induziert. Die Kulturen wurden anschließend pelletiert (13000 rpm; 2 min; Biofuge Pico, Heraeus), mit SDS-Probenpuffer (2 x) versetzt und für 5 Minuten bei 99°C im Thermomixer (Thermomixer Compact, Eppendorf) inkubiert. Je nach Expressionsstärke der Proteine bzw. Fusionskonstrukte wurden 20-400 µg Gesamtprotein für die SDS-Gelelektrophorese (200 V; 50-60 min; Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad) verwendet.

Westernblot

Zur spezifischen Detektion der untersuchten Proteine und Fusionskonstrukte mittels Antikörperfärbung wurden diese nach Auftrennung durch SDS-Gelelektrophorese mittels „semi-dry Blotting“ (Towbin et al. 1979) auf Nitrocellulosemembranen (Whatman, GE Healthcare) transferiert. Dafür wurden zwei Lagen Whatman-Papier in Transferpuffer

getränkt und auf der Anode des Pierce Fast Semi-Dry Blotters (Thermo Scientific) platziert. Darauf folgten die Nitrocellulosemembran, das SDS-Gel und erneut zwei Lagen Whatman-Papier, die ebenfalls alle in Transferpuffer inkubiert wurden. Zum Abschluss wurde die Kathode vorsichtig auf die oberste Whatman-Papierlage gesetzt. Der Proteintransfer erfolgte in 45 Minuten bei konstanter Stromstärke. Diese wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Stromstärke } I[\text{mA}] = \text{Fläche der Membran } [\text{cm}^2] \times 0,8 \times 2$$

Antikörperfärbung

Der Blot wurde nach dem Proteintransfer in 20 ml Blockingpuffer, entweder bei Raumtemperatur 1 Stunde auf dem Taumelschüttler oder über Nacht bei 4°C, inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 20 ml primäre Antikörperlösung gegeben. Vor und nach der Inkubation des Blots mit der sekundären Antikörperlösung erfolgten jeweils 3 Waschschriffe von 5 Minuten in 20 ml Waschpuffer. Bei der Behandlung des Blots in den Antikörperlösungen und bei den Waschschriffen wurden diese Ansätze pausenlos auf einem Taumelschüttler geschüttelt.

Im Anschluss an die Behandlung der Blots wurden die sekundären mit HRP-gekoppelten („horseradish peroxidase“) Antikörper entweder durch Chloronaphthol oder Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Chloronaphthol-Färbung erfolgte 30 Minuten bei Raumtemperatur in 50 ml Entwicklerlösung auf dem Taumelschüttler. Wohingegen beim viel sensitiveren Nachweis durch Chemilumineszenz lediglich 300 µl Immobilon Western HRP Substrat (Millipore) mit 300 µl der entsprechenden Peroxidlösung gemischt wurden und auf der Membran aufgetragen wurden. Der Blot wurde 5 Minuten inkubiert, trocken getupft und anschließend wurde die Lumineszenz durch Röntgenfilme (Amersham Hyperfilm ECL, GE Health Care) detektiert. Der Film wurde mit dem Röntgenfilm-Prozessor SRX-101 A (Konica Minolta) entwickelt.

Zellaufschluss und Membranisolierung der BACTH-Konstrukte

Nach der Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5000 rpm; 20 min; 4°C; Eppendorf 5403) und in Puffer 1 aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Mikrogaskugeln ($\varnothing = 0,1 \text{ mm}$) mit der FastPrep (6,5 m/s; 1 min; 6 Durchgänge; FastPrep®-24,

Biomedicals). Die löslichen und membrangebunden Proteine wurden durch Zentrifugation (11000 rpm; 20 min; 4°C; Eppendorf 5403) von den Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenen Zellen getrennt. Zur Isolierung der Membranfraktion wurde der Überstand in 1,5 ml Ultrazentrifugationsgefäße überführt und in einer Coulter Optima LE-80K Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) zentrifugiert (45000 rpm, 65 min, 4°C, Kontron TFT 70.38 Rotor). Das isolierte Membranpellet wurde mit SDS-Probenpuffer (2 x) versetzt und im Thermomixer (5 min; 99°C; Thermomixer Compact, Eppendorf) aufgeköcht. Nach anschließender SDS-Gelelektrophorese (200 V; 50-60 min; Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad) wurden die Proteine wie oben beschrieben auf Immunoblots nachgewiesen.

3.5 *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Studien wurden mit Fusionen des „enhanced yellow fluorescent protein“ (eYFP) durchgeführt. Bei diesem Derivat des „green fluorescent protein“ (GFP) wurden die Mutationen S65G, V68L, S72A und T203Y eingefügt. Diese Austausche verschieben die Anregungsmaxima (395 nm & 475 nm) und die Emissionswellenlänge (509 nm) von GFP zu 513 nm bzw. 527 nm (Ormö et al. 1996). Zusätzlich sollte der Austausch A206K, der bei einigen Konstrukten dieser Arbeit erstellt wurde, die Dimerisierung von YFP bei hohen Konzentrationen verhindern (Zacharias et al. 2002).

Die *E. coli* Stämme für die *in vivo* fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden aerob in LB gezüchtet und die YFP-Konstrukte mit L-Arabinose induziert. Im Anschluss an die Kultivierung wurde 1 ml Zellen durch Zentrifugation (13000 rpm; 2 min; Biofuge pico, Heraeus) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml PBS (1 x) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt und anschließend wurden die Zellen in 0,6 - 1 ml PBS (1 x) aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 5 µl entnommen und durch 1%ige Agarose (in 1 x PBS) auf einem Objektträger immobilisiert. Die zellulären Lokalisierungen der Fusionsproteine wurden unter einem Biozero BZ-8000 Fluoreszenzmikroskop (KEYENCE) analysiert.

3.6 Bioinformatische Methoden

Datenbanken

EcoCyc:	http://www.ecocyc.org
EcoGene:	http://www.ecogene.org
KEGG:	http://www.genome.jp/kegg/
NCBI:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
RCSB PDB:	http://www.pdb.org
Uniprot:	http://www.uniprot.org
addgene:	http://www.addgene.org/vector-database/

Literaturrecherche

PubMed:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
---------	---

Sequenzvergleiche

BLAST:	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ClustalW2:	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Spidey:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/
EMBOSS Needle:	http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/

Vorhersage von Transmembrandomänen

OCTOPUS:	http://octopus.cbr.su.se/
Phobius:	http://phobius.sbc.su.se/
TMHMM:	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
TMpred:	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
TOPCONS:	http://topcons.cbr.su.se/

TOPPRED: <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>

3D-Strukturvorhersagen

QUARK ONLINE: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>

SWISS-MODEL: <http://swissmodel.expasy.org/>

Bearbeitung und Darstellung von 3D-Strukturen

Chimera v1.8.1: <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

Weitere Tools

MG Berechnung: http://web.expasy.org/compute_pi/

Oligo Calc: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des bifunktionalen Charakters des Transporters

DctA

Die Expression von *dctA* aus *E. coli* wird durch das DcuS/DcuR-Zweikomponentensystem reguliert. Das *dctA* Gen kodiert für einen C₄-Dicarboxylat-Transporter mit bifunktionalem Charakter (Zientz et al. 1998; Golby et al. 1999). Unter aeroben Bedingungen sowie physiologischem pH von 7 fungiert DctA als Haupttransporter für C₄-Dicarbonsäuren (Kay & Kornberg 1969; Janausch et al. 2002a; Unden & Kleefeld 2004). Bei pH 5 hingegen übernimmt der Transporter DauA, welcher nicht durch DcuSR reguliert wird, die Aufnahme der C₄-Dicarbonsäuren (Karinou et al. 2013). Ferner fungiert DctA als Kosensor von DcuS im DcuSR-System (Witan et al. 2012a). Eine Deletion des Transporters DctA schaltet das DcuSR-System permanent in den ON-Zustand, und DcuSR benötigt dann keine C₄-Dicarbonsäuren mehr zur Induktion der DcuSR-kontrollierten Gene (Davies et al. 1999; Witan et al. 2012a). Analog zu DctA dient DcuB unter anaeroben Bedingungen als Transporter und Kosensor im DcuSR-System (Kleefeld et al. 2009). Somit benötigt das DcuSR-System immer die Anwesenheit von einem der beiden Transporter DctA oder DcuB um funktionsfähig bzw. ansprechbar für C₄-Dicarbonsäuren zu sein.

DctA formt durch eine spezifische Protein-Protein-Interaktion seiner cytoplasmatischen Helix 8b mit der PAS_C-Domäne von DcuS den DctA/DcuS-Sensorkomplex (Witan et al. 2012a; Witan et al. 2012b; Monzel et al. 2013). Dieser Sensorkomplex besitzt nach dem Funktionsmodell zwei Signaleingangsstellen für C₄-Dicarbonsäure, einerseits die periplasmatische PAS_P Sensordomäne von DcuS (Pappalardo et al. 2003; Kneuper et al. 2005; Cheung & Hendrickson 2008) und andererseits die Bindetasche von DctA (Witan et al. 2012b). Nach dem Modell von Witan et al. (2012a) stellen DctA oder DcuB das DcuSR-System in Abwesenheit von Effektoren ruhig. In Gegenwart von Substraten werden die Transporter katalytisch aktiv. Der transportaktive Zustand der Carrier überführt dann den Sensor DcuS in den betriebsbereiten Zustand. DcuS ist dann in der Lage mit seiner PAS_P Sensordomäne C₄-Dicarbonsäuren zu detektieren und seine Zielgene anzuschalten.

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt um ein besseres Verständnis von der Signaltransduktion sowie der Rolle von DctA im DctA/DcuS-Sensorkomplex zu gewinnen. Die Versuche sollten folgende Fragen beantworten:

- (1) Können die Transportaktivität von DctA und die regulatorische Funktion entkoppelt werden, oder sind beide Funktionen essentiell für die Rolle von DctA im Sensorkomplex?
- (2) Welche C₄-Dicarboxylat-Bindestelle ist für die Substraterkennung im DctA/DcuS-Sensorkomplex verantwortlich? Oder werden beide benötigt?
- (3) Wie läuft die Regulation durch DctA im Sensorkomplex ab?

4.1.1 Trennung von Transport und regulatorischer Funktion von DctA

Im Fall des anaeroben Antiporters DcuB ist es möglich die Sensor- und Transportfunktion mit Hilfe von Mutagenese zu trennen (Kleefeld et al. 2009). Die DcuB-Varianten DcuB(E79A) und DcuB(R83A) weisen einerseits wildtypische regulatorische Funktionen auf, das DcuSR-System kann somit durch Fumarat immer noch angeschaltet werden. Andererseits ist ihre Aufnahmeaktivität für [¹⁴C]-Succinat stark beeinträchtigt. Bei den Varianten DcuB(T394I) und DcuB(D398N) hingegen ist die Transportfunktion noch intakt, aber das DcuSR-System befindet sich bereits ohne den Effektor Fumarat im ON-Zustand.

Um einen tieferen Einblick in den bifunktionalen Charakter von DctA zu gewinnen, wurde mit zwei separaten Ansätzen versucht die regulatorische Funktion von der katalytischen Aufnahmeaktivität zu trennen. Ähnlich wie bei DcuB wurde mittels ungerichteter Mutagenese aber ebenso anhand von zielgerichteter Mutagenese DctA-Varianten gesucht, bei denen nur noch eine der beiden Funktionen intakt ist. Solche Mutanten geben Aufschluss über die Notwendigkeit von Transport für die regulatorische Funktion.

4.1.1.1 Ungerichtete Mutagenese von DctA

Die ungerichtete Mutagenese wurde mittels „error-prone PCR“ (Cadwell & Joyce 1992) durchgeführt. Dabei wurde ein C-terminales Fragment von DctA amplifiziert. Die PCR wurde mit Überschuss von Taq-Polymerase, MgCl₂ und einer erhöhten Zyklenanzahl durchgeführt. Die so produzierten DctA-Fragmente, darunter auch mutierte Varianten, wurden in den

Vektor pMW2156, der DctA mit nativem Promotor enthält, eingefügt. Die Ligationsprodukte wurden anschließend in den *E. coli* Stamm IMW386 (Kleefeld 2002) transformiert und auf eM9-Platten mit 50 mM Glycerin und variierenden X-Gal Konzentrationen ausplattiert. Der DctA-defiziente Stamm IMW386 besitzt das Reportergen *dctA-lacZ*, welches zum Screening für regulatorisch-defiziente DctA-Varianten verwendet wurde. Bei Kolonien, die auf den eM9-Platten eine blaue Färbung zeigen, befindet sich das DcuSR-System bereits ohne einen Effektor im ON-Zustand. Positive Klone wurden Wachstumstests auf eM9-Platten mit Fumarat als einziger Kohlenstoffquelle unterzogen und anschließend deren Austausch durch Sequenzierung ermittelt. Das Screeningsystem erwies sich jedoch als ungeeignet zur Identifizierung der gewünschten Mutanten, da die selektierten Klone entweder in ihrer regulatorischen und katalytischen Funktion gestört waren oder keine Beeinträchtigung dieser Funktionen aufwiesen. Durch Variation der X-Gal-Konzentration und der Verwendung des alternativen Substrates 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid (MUG) konnte die Ausbeute der falschpositiven Klone jedoch nicht reduziert werden. Ein weiterer Ansatz mit dem Plasmid pMW2030, bei dem DctA unter Kontrolle eines L-Arabinose induzierbaren Promotors steht, den DcuB-defizienten Stamm IMW503 (Kleefeld et al. 2009) unter anaeroben Bedingungen zu komplementieren, schlug aufgrund zu hoher Hintergrundaktivität des Reportergens *dcuB-lacZ* fehl. Die Selektion zwischen wildtypischen und regulatorisch-defizienten DctA-Varianten war nicht erfolgreich.

4.1.1.2 Sequenz- und Strukturanalyse von DctA zur Identifikation von potentiellen Mutationsorten

Als Konsequenz der Screeningproblematik der ungerichteten Mutagenese wurden vielversprechende Mutationsorte für die zielgerichtete Mutagenese anhand von Sequenz- und Strukturanalysen ermittelt.

DctA aus *E. coli* (DctA_{Ec}) sowie die DctA-Symporter aus *Pseudomonas fluorescens* (DctA_{Pf}) und *Rhizobium meliloti* (DctA_{Rm}) gehören zu der DAACS-Transporterfamilie (dicarboxylate amino acid:cation symporter). Ebenso zu dieser Familie gehören die Aminosäuretransporter GltP aus *E. coli* (GltP_{Ec}) und Glt aus *Pyrococcus horikoshii* (Glt_{Ph}). DctA_{Ec} weist Sequenzidentitäten von 73 % und 60 % mit DctA_{Pf} bzw. DctA_{Rm} auf (Witan 2012). Die

Aminosäuresequenzidentität zwischen DctA_{Ec} und den Glutamat-Transportern GltP_{Ec} und Glt_{ph} hingegen liegen bei lediglich 37 % bzw. 26 %.

Ein Sequenzvergleich der vermeintlichen Bindetaschen dieser Symporter ist in Abb. E1 dargestellt. Die Aminosäurereste von Glt_{ph}, die für die Transportfunktion vorherhergesagt wurden (Yernool et al. 2004) sowie deren homologen Reste, sind rot hinterlegt. Interessanterweise beträgt die Sequenzidentität dieser 20 Aminosäurereste der Substratbindetasche für alle fünf DAACS-Transporter 65 %. Aufgrund dieses hohen Prozentsatzes an konservierten Resten in der Bindetasche, wurde die Auswirkung gezielter Aminosäureaustausche dieser Reste auf die Funktion von DctA betrachtet. Dabei wurden die Aminosäurereste fast ausschließlich zu Alanin bzw. zum Glt_{ph}-homologen Aminosäurerest substituiert.

DctA_ECOLI	LIICFYITCILFVVLVLSIAKATGFSIFKFIKYIREELLIVLGFSSSES	271
DctA_PSEFS	LMICFYITCLLFVVLVGGICRAHGFSVIKLIKYIREELLIVLGFSSSES	273
DctA_RHIME	LIGTFYLTSLFVFIVLGAVARYNGFSILSLIRYIKEELLVLCFSSSEA	281
GltP_ECOLI	LVLVHFALFFALVVLGIVARLCLGSLVWILIRILKDELILAYSFASSES	282
Glt_PYRHO	VTAAYVGLTLQILLVYFVLLKIYGDIPISFIKKAKDAMLTAFTFSSSG	280
	: . . . : .:* : : *:. :*: :. :. . * * *..	
DctA_ECOLI	ALPRMLDKMEKLGCRKRSVGLVIPTGYSEFLDGTISYITMAAVFIAQATN	321
DctA_PSEFS	ALPRMLIKMERLGAKKSVVGLVIPTGYSEFLDGTISYITMAAVFIAQATD	323
DctA_RHIME	ALPGLMNKMEKAGCKRSVGLVIPTGYSEFLDGTININITLAALFIAQATD	331
GltP_ECOLI	VLPRIIIEKMEAYGAPASITSFVVPYGYSEFLDGTITLYCSIAAIFIAQLYG	332
Glt_PYRHO	TLPVTMRVAKEMGISEGIYSFTLPLGATINMDGTALYQGVCTFFIANALG	330
	.*. : : * .: .:.* * :.*:.*: :* :.:.***: .	
DctA_ECOLI	SQMDIVHQITLLIVLLLSKGAAGVTCSGFIIVLAATLSAVGH-----LPV	366
DctA_PSEFS	THMDITHQITLLLVLLLSKGAAGVTCSGFIIVLAATLSAVGH-----LPV	368
DctA_RHIME	TPLSYGDQIILLVAMLSKGAAGITCAGFITLAATLSVVP-----VPV	376
GltP_ECOLI	IDLSIWQEIILVLTLMVTSKGIAGVPCVSVFVLLATLGSV-----IPL	376
Glt_PYRHO	SHLTVGQQLTIVLTAVLASIGTAVPCAGAIMLAMVLESVGLPLTDPNVA	380
	: .: :.:. :.* * *:. * . : * . * *	
DctA_ECOLI	AGLALILGIDRFMSRARLTLNLVNGVATIVVAKWVKELDHKKLDDVLNN	416
DctA_PSEFS	AGLALILGIDRFMSRARLTLNLVNAVATIVVAKWVKELDTDKLQSELAS	418
DctA_RHIME	AGMALILGIDRFMSECRALTNFVNAVATIVVAKWEGELDQAQLSALGG	426
GltP_ECOLI	EGLAFIAGVDRIILMARTALNVVNALAVLVIAKWEHKFDRKK---ALAY	423
Glt_PYRHO	AAYAMILGIDAILMGRTMVNVTDLTGTAVIAKTEGELEKGVIA-----	425
	. *:* *:* :. : * : *.*: . . :.* :.:	
DctA_ECOLI	RAP-DGKTHELSS-----	428
DctA_PSEFS	GGTGISETREIDDLGVAEGPAPVVK	443
DctA_RHIME	EASVEAIPAVVQPAE-----	441
GltP_ECOLI	EREVLGKFDKTADQ-----	437
Glt_PYRHO	-----	

Abb. E1: Sequenzvergleich der vermutlichen Bindetasche von DctA aus *E. coli* mit verwandten Transportern aus der DAACS Familie. Die Aminosäuresequenz der einzelnen Proteine wurde aus der UniProt Datenbank entnommen und mit Hilfe von CLUSTALW (Larkin et al. 2007) verglichen. Die Aminosäuren die bei Glt aus *Pyrococcus horikoshii* für den Glutamattransport vorhergesagt wurden (Yernool et al. 2004) sowie deren homologen Reste sind rot gekennzeichnet. ECOLI: *Escherichia coli*; PSEFS: *Pseudomonas fluorescens*; DctA RHIME: *Rhizobium meliloti*; PYRHO: *Pyrococcus horikoshii*

DctA aus *E. coli* besitzt topologische Ähnlichkeiten zu Glt aus *Pyrococcus horikoshii* (Witan et al. 2012a). Die Kristallstruktur von Glt_{ph} ist bekannt (Yernool et al. 2004; Boudker et al. 2007). Diese Strukturen zeigen, dass sich sowohl N- als auch C-Terminus des Transporters im Cytoplasma befinden sowie das Vorhandensein von acht Transmembranhelices (TM1-8) und zwei Haarnadelschleifen (HP1-2). Für DctA_{Ec} konnte unter Verwendung von bioinformatischen Analysen gemeinsam mit PhoA/LacZ-Topologiestudien ebenfalls die gleiche Orientierung der Termini sowie acht TMs und zwei HPs nachgewiesen werden (Witan et al. 2012a). Zusätzlich besitzt DctA die periplasmatische Helix 3b und die cytoplasmatische Helix 8b, für diese beiden Helices weist Glt_{ph} keine homologen Bereiche auf. Angesichts der Bedeutung von Helix 8b für die Interaktion von DctA mit DcuS für den DctA/DcuS-Sensorkomplex, wurden auch hier etliche Aminosäuresubstitutionen durchgeführt. Dabei wurden hauptsächlich die Leucinreste des LX₄LX₃L-Motivs der Helix 8b sowie deren geladene Aminosäurereste substituiert.

Abb. E2 zeigt eine Strukturvorhersage für DctA mit allen durchgeführten Aminosäuresubstitutionen. Diese 3D-Struktur wurde vom SWISS-Model-Server (Arnold et al. 2006) auf der Grundlage der Kristallstruktur von Glt_{ph} (Boudker et al. 2007; PDB ID: 2NWX) berechnet. Die Struktur der Helix 8b wurde zusätzlich durch den QUARK ONLINE Server (Xu & Zhang 2012) vorhergesagt. Mit dem Programm UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) wurde die 3D-Struktur von Helix 8b an den C-Terminus des DctA Modells modelliert und als Gesamtstruktur visualisiert. Die Mutationsorte aller Substitutionen sind durch die Aminosäurereste in den Strukturen abgebildet. Helix 8b und die Substratbindetasche mit gebundener Asparaginsäure sind vergrößert dargestellt (schwarze Kästen). Insgesamt wurden 62 Substitutionen an 41 Positionen durchgeführt. Die Aminosäureaustausche in DctA erfolgten mittels zielgerichteter Mutagenese im Plasmid pMW1194 (Witan et al. 2012a). Bei diesem Expressionsvektor steht die Synthese von His₆-DctA-His₆ unter der Kontrolle eines L-Arabinose induzierbaren Promotors. Die grün gekennzeichneten Mutationsorte in den Teilstrukturen sind eine repräsentative Auswahl von DctA-Varianten, auf die in den folgenden Funktionsstudien genauer eingegangen wird. Dabei liegen die Aminosäurereste N301, S380 sowie R383 in TM7 bzw. TM8 und sind Teil der Substratbindetasche. Rest L414 befindet sich in der cytoplasmatischen Helix 8b. Die Ergebnisse der Funktionstests der übrigen DctA-Varianten sind im Anhang zusammengefasst.

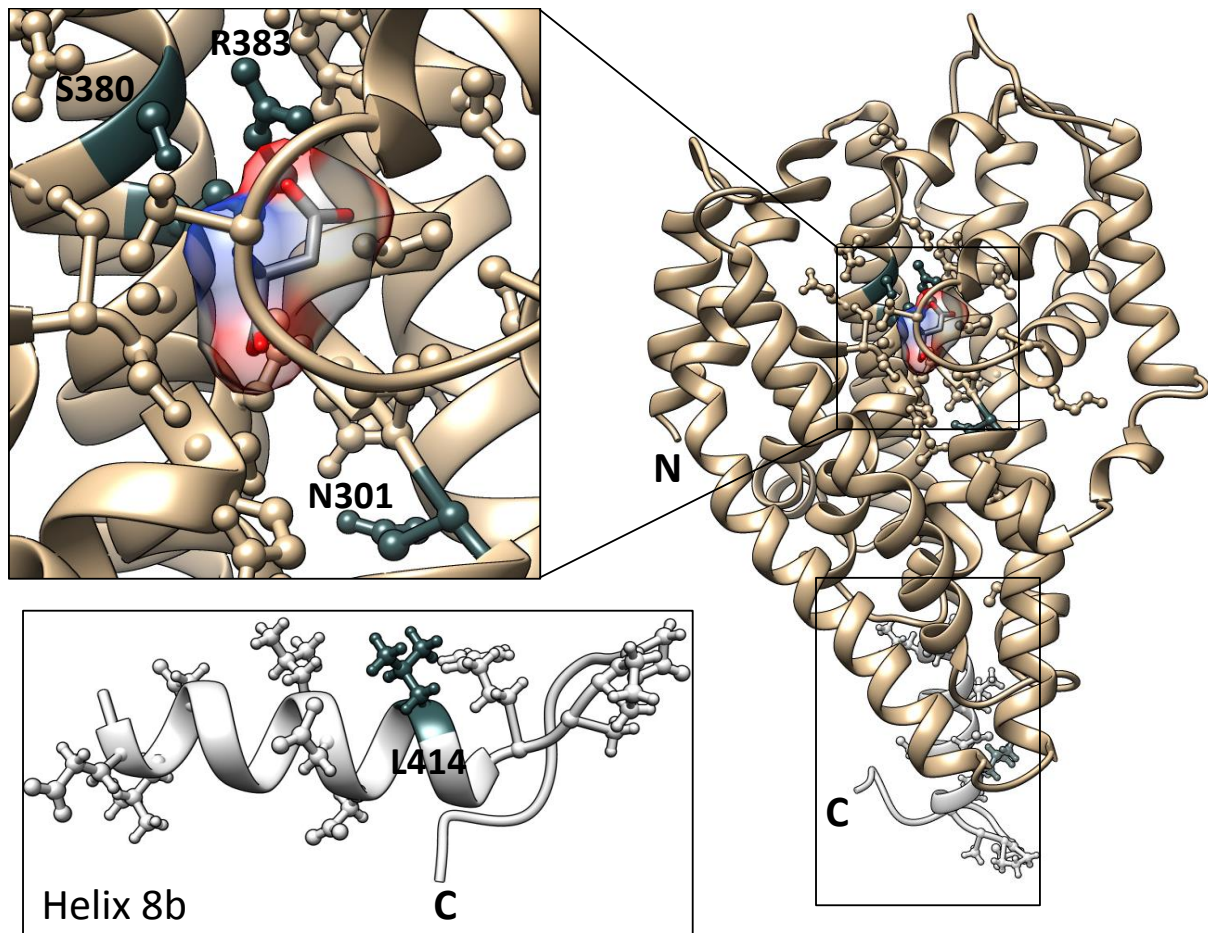


Abb. E2: Strukturmodell von DctA aus *E. coli* mit Angabe von Mutationsorten. Das Modell von DctA (beige) wurde auf der Grundlage der Kristallstruktur des Transporters Glt_{ph} (Boudker et al. 2007; PDB ID: 2NWX) vom SWISS-MODEL Server (Arnold et al. 2006) vorhergesagt. Die cytoplasmatische Helix 8b (hellgrau) wurde zusätzlich vom *ab initio* Proteinstrukturvorhersage Server QUARK ONLINE (Xu & Zhang 2012) modelliert und mit dem DctA Modell am C-Terminus verbunden. Die 3D-Strukturen wurden durch UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) bearbeitet und dargestellt. Aminosäurereste, die substituiert wurden, sind im Modell dargestellt. Auf die dunkelgrünen Aminosäurereste wird in den folgenden Versuchen noch genauer eingegangen. Die vermeintliche Substratbindestelle mit gebundenen Aspartat sowie die cytoplasmatische Helix 8b sind vergrößert dargestellt (schwarze Kästen).

4.1.1.3 Die Regulatorische Funktion der DctA-Varianten

Das DcuSR-System detektiert C_4 -Dicarbonsäuren und stimuliert die Expression seiner Zielgene (Zientz et al. 1998; Golby et al. 1999). Die Anwesenheit des Symporters DctA oder des Antiporters DcuB wird für die Funktionsfähigkeit des DcuSR-Systems benötigt (Davies et al. 1999; Kleefeld et al. 2009; Witan et al. 2012a). Eine Deletion von DctA oder DcuB schaltet unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen das DcuSR-System permanent in den ON-Zustand, C_4 -Dicarbonsäuren werden demnach nicht mehr benötigt um die DcuSR-kontrollierten Gene zu induzieren. Der Stamm IMW503 (Kleefeld et al. 2009) trägt neben einer DcuB-Deletion ebenfalls eine chromosomale *dcuB-lacZ* Reporterfusion, mit dieser

kann der Aktivitätszustand des DcuSR-Systems anhand von β -Galactosidaseaktivitätsmessungen bestimmt werden. Das Plasmid pMW1194, welches wildtypisches DctA trägt, ist in der Lage die regulatorische Funktion von DcuB unter anaeroben Bedingungen zu komplementieren (Witan et al. 2012a). Die regulatorische Funktion der DctA-Varianten wurde anaerob im DcuB-defizienten Stamm IMW503 anhand der Aktivität der β -Galactosidase bestimmt, da die *dcuB-lacZ* Expression als Antwort auf das funktionale DcuSR-System eine höhere Aktivität und Spezifität aufweist als dessen aerob exprimierte Zielgene (Witan et al. 2012a).

Das Plasmid pMW1194 sowie dessen Derivate wurden in den Stamm IMW503 transformiert. Die Stämme für die Funktionsmessungen wurden anaerob in angereichertem M9 Medium (eM9) bei pH 7 in Gegenwart und Abwesenheit des Effektors Na_2 -Fumarat (20 mM) kultiviert. Als Kohlenstoffquelle diente Glycerin (50 mM) und DMSO (20 mM) wurde als Elektronenakzeptor verwendet. DctA sowie dessen Varianten wurden mit L-Arabinose (50 μM) induziert.

Abbildung E3 zeigt die Funktionskomplementation von IMW503 (DcuB-) mit pMW1194 (pDctA(Wt)). Stamm IMW237 (Wt) (Zientz et al. 1998) dient hier als Positivkontrolle. Er trägt ein funktionsfähiges chromosomales *dcuB* und eine *dcuB-lacZ* Reporterfusion. Das DcuSR-System des Stammes IMW237 spricht auf Fumarat an, die Anwesenheit des Effektors führt zu einer 6,7fachen Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ* im Vergleich zum Stamm ohne Fumarat. Bei IMW503 (DcuB-) hingegen ist die *dcuB-lacZ* Expression in Abwesenheit von Fumarat bereits maximal. Die Zugabe des Effektors hat keine Auswirkung auf die Reporterexpression, somit befindet sich das DcuSR-System auch in Abwesenheit des Effektors permanent im ON-Zustand. Stamm IMW503 komplementiert mit pMW1194 (DcuB-pDctA(Wt)) besitzt ein ähnliches Expressionsmuster wie der Wildtyp-Stamm IMW237. Es kommt jedoch in Gegenwart des Effektors Fumarat nur zu einer Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ* um den Faktor 3,6. Nichtsdestotrotz reagiert das DcuSR-System noch auf seine Effektoren und diese Kombination bietet eine signifikante und effiziente Methode um DctA-Varianten auf ihre regulatorische Funktion zu untersuchen.

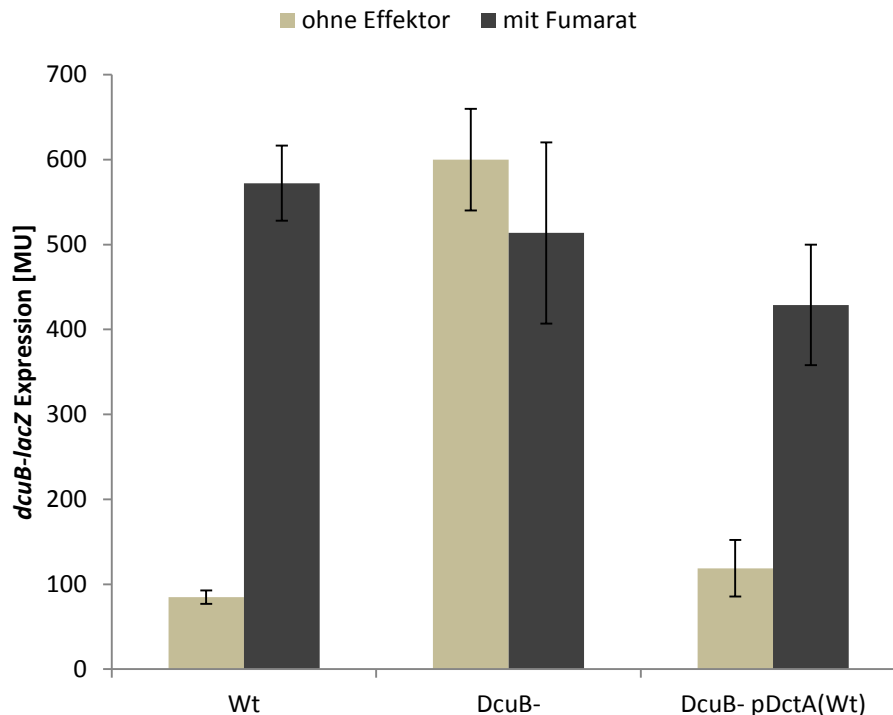


Abb. E3: Funktionskomplementation des DcuB-defizienten Stammes IMW503 durch pDctA(Wt). Die Kulturen wurden anaerob in eM9-Medium bis in die exponentielle Wachstumsphase gezüchtet und anschließend wurde die *dcuB-lacZ* Expression anhand der β -Galactosidaseaktivität bestimmt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige Balken). Des Weiteren wurde 20 mM Fumarat als Effektor für das DcuS/DcuR-System verwendet (dunkelgraue Balken). DctA wurde mit 50 μ M L-Arabinose vom Plasmid pMW1194 exprimiert. Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Positivkontrolle diente *E. coli* Stamm IMW237 (Wt). Wt: IM237; DcuB-: IMW503; pDctA(Wt): pMW1194

Bezüglich ihrer regulatorischen Funktion lassen sich die DctA-Varianten (Abb. E4) grob in drei Gruppen einteilen. Die Wt-Varianten DctA(S380A), DctA(S380D) und DctA(R383N) besitzen ein ähnliches Expressionsmuster wie der Stamm IMW503 komplementiert mit pMW1194 (DcuB- pDctA(Wt)). Die Gegenwart des Effektors führt zu einer erheblichen Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ* im Vergleich zu dessen Abwesenheit. Diese DctA-Varianten sind regulatorisch aktiv und überführen das DcuSR-System in den funktionsbereiten Zustand. Im Gegensatz dazu verhalten sich die vollständigen ON-Varianten DctA(N301A) und DctA(S380N) wie Stamm IMW503(DcuB-). Die Reporterexpression ist bereits ohne Effektor maximal und kann durch Hinzugabe von Fumarat nicht gesteigert werden. DctA(N301A) und DctA(S380N) sind regulatorisch-defizient, das DcuSR-System befindet sich bereits vor der Effektorzugabe im ständigen ON-Zustand. Die unvollständigen ON-Varianten DctA(S380I), DctA(S380Q) und DctA(L414A) haben bereits ohne Effektor eine

hohe *dcuB-lacZ* Reporterexpression. Diese kann durch Fumarat nur minimal gesteigert werden. Die regulatorische Funktion ist bei diesen Varianten stark beeinträchtigt.

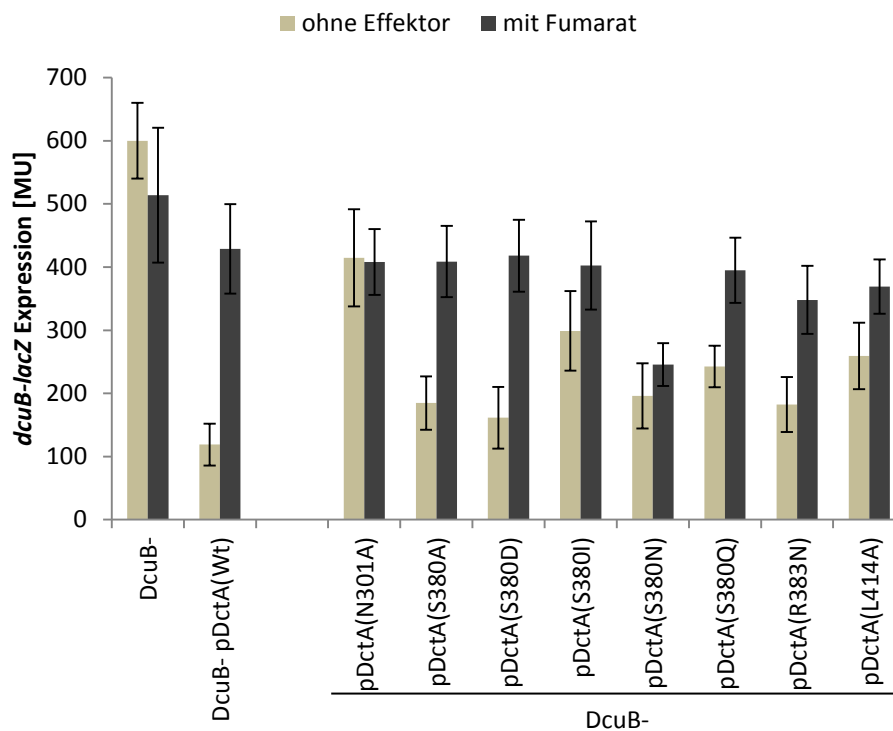


Abb. E4: Die regulatorische Funktion der DctA-Varianten. Der DcuB-defiziente Stamm IMW503 (DcuB-) wurde mit Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μ M L-Arabinose induziert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die *dcuB-lacZ* Expression der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige Balken). 20 mM Fumarat wurde als Effektor benutzt (dunkelgraue Balken). Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. DcuB-: IMW503; pDctA(Wt): pMW1194; pDctA(N301A): pMW1945; pDctA(S380A): pMW1866; pDctA(S380D): pMW1868; pDctA(S380I): pMW1867; pDctA(S380N): pMW2159; pDctA(S380Q): pMW2158; pDctA(R383N): pMW2161; pDctA(L414A): pMW1271

4.1.1.4 Wachstumsexperimente der DctA-Varianten

Beim aeroben Wachstum bei pH 7 katalysiert der Transporter DctA die Aufnahme von C_4 -Dicarboxylaten, wie Fumarat (Kay & Kornberg 1969; Jansch et al. 2002a; Uden & Kleefeld 2004). Unter sauren Bedingungen (pH 5) hingegen wird die C_4 -Dicarboxylat-Aufnahme durch den Transporter DauA katalysiert (Karinou et al. 2013). Dieser steht nicht unter Kontrolle des DcuSR-Systems. Die aufgenommenen Dicarbonsäuren werden direkt im Tricarbonsäurezyklus verstoffwechselt (Kay & Kornberg 1971). Lediglich eine Deletion der Succinatdehydrogenase führt zur Anhäufung von Fumarat in der Zelle (Lo et al. 1972). DctA-defiziente Mutanten weisen einen Wachstumsverlust mit den Substraten Fumarat, Malat und Succinat auf (Davies

et al. 1999). Dieser Wachstumsdefekt kann jedoch durch plasmidkodiertes DctA aufgehoben werden.

Die Wachstumsversuche der DctA-Varianten wurden mit dem Stamm MDO800 (DctA-) (Davies et al. 1999) durchgeführt. Dessen *dctA* Gen wurde durch die Insertion einer Spectinomycin-Resistenzkassette ausgeschaltet. Die DctA-Defizienz von MDO800 wurde durch das Plasmid pMW1194 (pDctA(Wt)) bzw. dessen Derivate komplementiert (Abb. E5). Die Wachstumsexperimente erfolgten aerob bei pH 7 in eM9-Medium mit Na₂-Fumarat (50 mM) als Kohlenstoff- und Energiequelle. Die DctA-Varianten wurden durch L-Arabinose (50 µM) induziert.

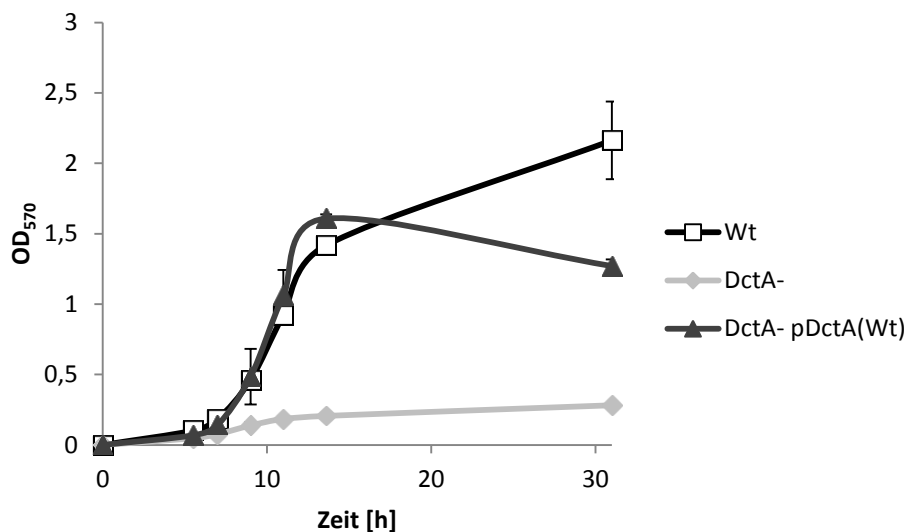


Abb. E5: Wachstumskomplementation des DctA-defizienten Stammes MDO800 mit pDctA(Wt). Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in eM9-Medium mit 50 mM Fumarat als Wachstumssubstrat. Die optische Dichte OD_{570nm} der Kulturen wurde nach regelmäßigen Abständen bestimmt. DctA wurde mit 50 µM L-Arabinose vom Plasmid pMW1194 exprimiert. Als Positivkontrolle diente *E. coli* Stamm AN387 (Wt). Wt: AN387; DctA-: MDO800; pDctA(Wt): pMW1194

Abbildung E5 zeigt die Wachstumskomplementation des DctA-defizienten Stammes MDO800 (DctA-) durch den Expressionsvektor pMW1194 (pDctA(Wt)). Stamm AN387 (Wt) diente bei diesem Versuch als wildtypische Kontrolle. Dieser Stamm bildet funktionales DctA und wächst mit Fumarat als einzigem Wachstumssubstrat. Im Gegensatz dazu kann MDO800 (DctA-) unter diesen Bedingungen nicht wachsen, da der Leserahmen von *dctA* durch die Insertionsmutante gestört ist. Der Wachstumsdefekt von MDO800 kann jedoch durch pMW1194 (DctA- pDctA(Wt)) komplementiert werden. Dieser Stamm zeigt wildtypisches Wachstumsverhalten.

In Abb. E6 ist das Wachstumsverhalten der DctA-Varianten nach 11 Stunden mit Fumarat als einzigem Substrat dargestellt. Die vollständigen Wachstumskurven dieser Varianten befinden sich in Abbildung A3 im Anhang. DctA(S380A), DctA(S380N), DctA(S380Q) und DctA(R383N) besitzen vergleichbares Wachstum auf Fumarat zu Stamm AN387 (Wt) bzw. zu Stamm MDO800 komplementiert mit pMW1194 (DctA- pDctA(Wt)). Diese Substitutionen von DctA haben keinen Einfluss auf das Wachstum mit Fumarat. Im Vergleich dazu weisen DctA(N301A), DctA(S380D), DctA(S380I) sowie DctA(L414A) beträchtliche Wachstumsdefekte auf. Ihr Wachstumsverhalten nach 11 Stunden gleicht eher dem des DctA-defizienten Stammes MDO800.

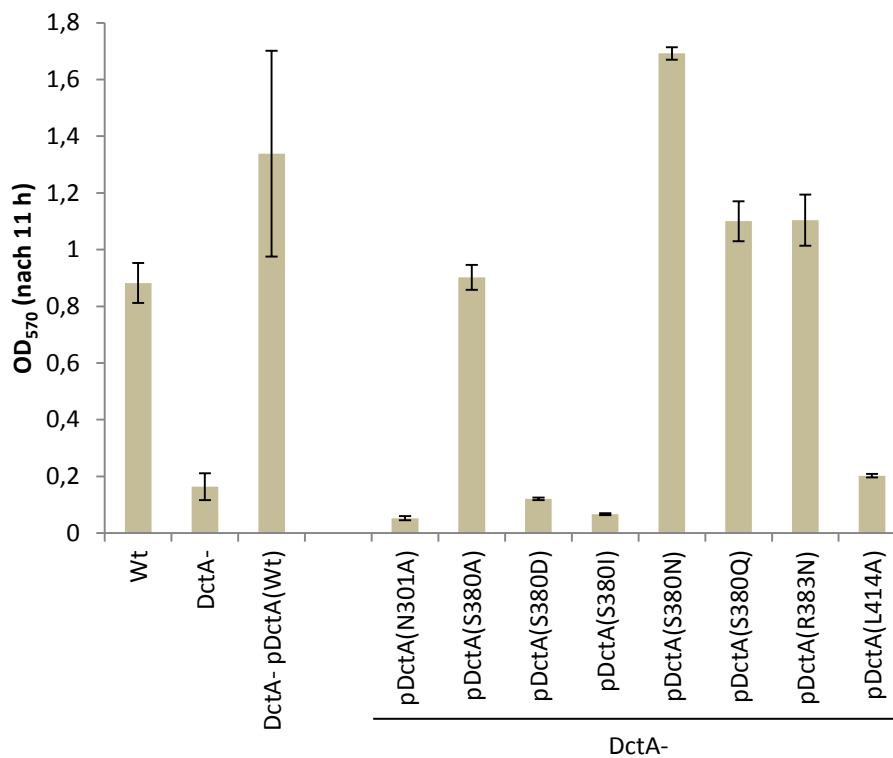


Abb. E6: Wachstumstests der DctA-Varianten. Der DctA-defiziente Stamm MDO800 (DctA-) wurde mit den Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μ M L-Arabinose induziert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in eM9-Medium mit 50 mM Fumarat als Wachstumssubstrat. Die optische Dichte OD_{570nm} der Kulturen wurde nach 11 Stunden bestimmt. Als Positivkontrolle diente *E. coli* Stamm AN387 (Wt). Wt: AN387; DctA-: MDO800; pDctA(Wt): pMW1194; pDctA(N301A): pMW1945; pDctA(S380A): pMW1866; pDctA(S380D): pMW1868; pDctA(S380I): pMW1867; pDctA(S380N): pMW2159; pDctA(S380Q): pMW2158; pDctA(R383N): pMW2161; pDctA(L414A): pMW1271

4.1.1.5 Transportfunktion der DctA-Varianten

DctA katalysiert unter aeroben Bedingungen die Aufnahme von C₄-Dicarbonsäuren im Symport mit zwei Protonen (Kay & Kornberg 1969; Gutowski & Rosenberg 1975). Die Aufnahme von Fumarat kann kompetitiv durch Aspartat, Malat, sowie Succinat gehemmt

werden. Die Substanzen Asparagin, Glutamat, Oxalacetat, Oxoglutarat, Laktat, Pyruvat und Acetat haben hingegen keinen Einfluss auf den Fumarattransport (Kay & Kornberg 1969; Davies et al. 1999).

Die Transportfunktion der DctA-Varianten wurde durch Aufnahmemessungen mit $[2,3-^{14}\text{C}]$ -Fumarat bestimmt. Die Studien wurden mit dem DctA-defizienten Stamm MDO800 (DctA-) in Kombination mit Derivaten des Expressionsplasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) realisiert. Die Kulturen wurden aerob in LB Medium gezüchtet, damit die unterschiedlichen DctA-Varianten eine vergleichbare Zelldichte für die Aufnahmeuntersuchungen besaßen. Die DctA-Varianten wurden durch L-Arabinose (50 μM) induziert.

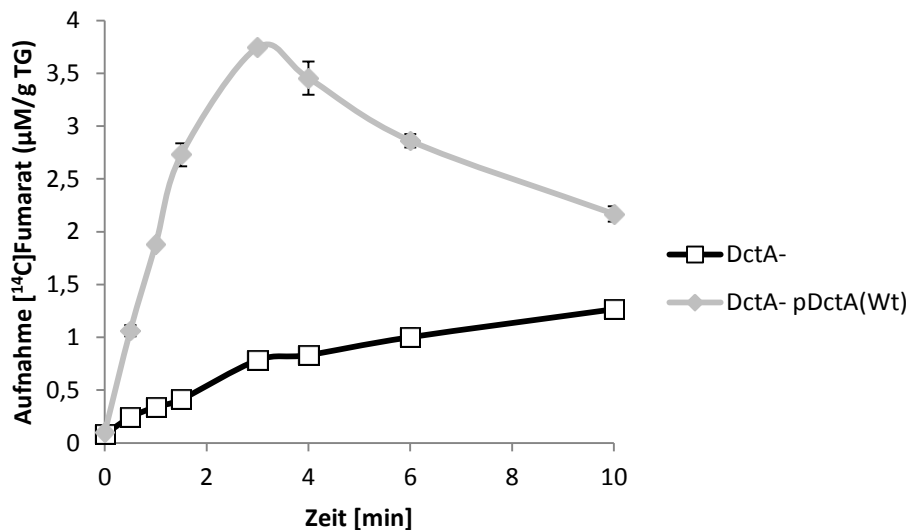


Abb. E7: Transportkomplementation des DctA-defizienten Stammes MDO800 mit pDctA(Wt). Der Stamm MDO800 (DctA-) wurde mit dem Plasmid pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μM L-Arabinose exprimiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium. Die Transportmessungen wurden mit 20 μM $[^{14}\text{C}]$ -Fumarat durchgeführt. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden Proben entnommen. DctA- : MDO800; pDctA(Wt): pMW1194

Die Transportkomplementation des Stammes MDO800 (DctA-) mit pMW1194 (pDctA(Wt)) wurde mit 20 μM $[^{14}\text{C}]$ -Fumarat untersucht (Abb. E7). Der Vergleich der Aufnahmekinetiken der Stämme MDO800 (DctA-) und MDO800 mit pMW1194 (DctA- pDctA(Wt)) veranschaulicht, dass der Transportdefekt von MDO800 durch plasmidkodiertes DctA kompensiert werden kann. Die Aufnahmekapazität von Fumarat des komplementierten Stammes (DctA- pDctA(Wt)) übertrifft die von MDO800 (DctA-) um ein Vielfaches. Der Rückgang der Fumarataufnahme von MDO800 mit pMW1194 (DctA- pDctA(Wt)) nach drei

Minuten kann auf den direkten Umsatz des aufgenommenen $[^{14}\text{C}]$ -Fumarat im Tricarbonsäurezyklus der Zellen zurückgeführt werden.

Des Weiteren wurden Transportkinetiken von MDO800 mit pMW1194 (DctA- pDctA(Wt)) mit unterschiedlichen $[^{14}\text{C}]$ -Fumaratkonzentrationen (20, 50 & 100 μM) erstellt, um die optimale Fumaratkonzentration sowie die geeignete Messdauer für die Transportmessungen der DctA-Varianten zu ermitteln (Abb. E8). Dabei ist zu beachten, dass DctA unter den Messbedingungen mit $[^{14}\text{C}]$ -Fumarat gesättigt ist und sich im linearen Bereich der Kinetik befindet. Aus diesen Gründen wurden die Aufnahmestudien mit den DctA-Varianten mit 50 μM $[^{14}\text{C}]$ -Fumarat für 30 Sekunden durchgeführt.

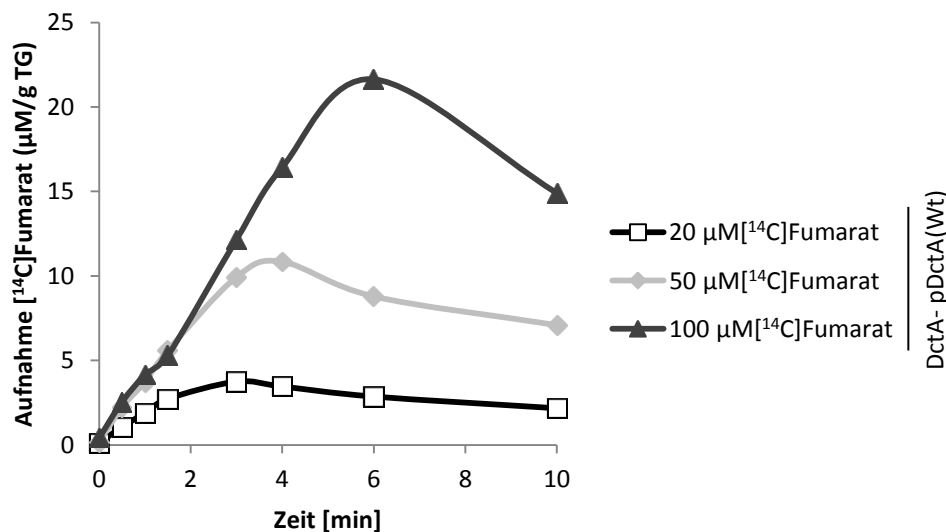


Abb. E8: Bestimmung der $[^{14}\text{C}]$ -Fumaratkonzentration für die Transportmessungen. Der Stamm MDO800 (DctA-) wurde mit dem Plasmid pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μM L-Arabinose exprimiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium. Die Transportmessungen wurden mit 20 μM , 50 μM und 100 μM $[^{14}\text{C}]$ -Fumarat durchgeführt. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden Proben entnommen. DctA- : MDO800; pDctA(Wt): pMW1194

In Abbildung E9 sind die Transportmessungen der DctA-Varianten zusammengefasst. Die Aufnahmekapazität von MDO800 komplementiert mit pMW1194 (DctA- pDctA(Wt)) wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Stämme dementsprechend standardisiert. Der Stamm MDO800 (DctA-) erreicht unter diesen Bedingungen nicht mehr als 5% dieser Aufnahmeaktivität. Lediglich DctA(S380A) von den untersuchten DctA-Varianten erreicht mit 71% eine vergleichbare Transportrate zu wildtypischem DctA. Bei allen weiteren DctA-Varianten ist die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -Fumarat erheblich herabgesetzt. Ihre Aufnahmekapazitäten liegen mit 8-14 % nur minimal über der von MDO800 (DctA-). Die

Substitutionen N301A, S380D, S380I, S380N, S380Q, R383N sowie L414A greifen somit massiv in die Transportkapazität von DctA ein.

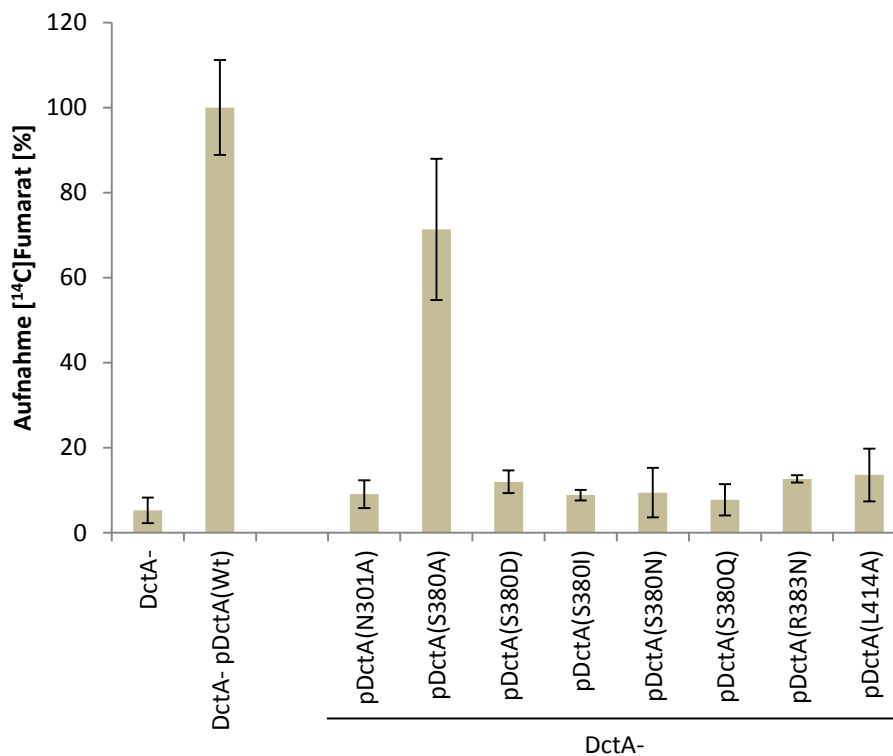


Abb. E9: Transportmessungen der DctA-Varianten. Der DctA-defiziente Stamm MDO800 (DctA-) wurde mit den Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μ M L-Arabinose induziert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium. Die Transportmessungen wurden mit 50 μ M [¹⁴C]-Fumarat durchgeführt und die Proben wurden jeweils nach 30 sec entnommen. Die [¹⁴C]-Fumarataufnahme von pDctA(Wt) wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. DctA-: MDO800; pDctA(Wt): pMW1194; pDctA(N301A): pMW1945; pDctA(S380A): pMW1866; pDctA(S380D): pMW1868; pDctA(S380I): pMW1867; pDctA(S380N): pMW2159; pDctA(S380Q): pMW2158; pDctA(R383N): pMW2161; pDctA(L414A): pMW1271

Die Funktionsanalysen der DctA-Varianten offenbaren, dass bei der Mehrheit der Aminosäureaustausche entweder keine oder beide Funktionen des Transporters beeinträchtigt werden. Ähnliches trifft auf die meisten DctA-Varianten zu, die im Anhang zusammengefasst sind. So sind bei den Kandidaten DctA(N301A), DctA(S380I), DctA(S380N), DctA(S380Q) und DctA(L414A) die regulatorische Funktion und die Aufnahmeaktivität beeinträchtigt. Variante DctA(S380A) andererseits verhält sich wie wildtypisches DctA in den Funktionstests. Es konnten jedoch die Varianten DctA(S380D) und DctA(R383N) identifiziert werden, bei denen die regulatorische Funktion im Wesentlichen intakt ist, die Transportaktivität aber stark herabgesetzt ist. Besonders Variante DctA(S380D) ist hier hervorzuheben, da der Transportdefekt durch gehemmtes Wachstum auf C₄-Dicarbonsäuren

bestätigt wird. Die regulatorische Eigenschaft von DctA wurde bei dieser Substitution erfolgreich vom Transport entkoppelt. Die Varianten der Aminosäureaustausche S380N, S380Q und R383N hingegen wachsen einerseits wildtypisch auf Fumarat, zeigen andererseits aber einen Transportdefekt. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch eine verminderte Affinität der Varianten zum Substrat Fumarat erklärt werden. Die Fumaratkonzentration bei den Wachstumstests war mit 50 mM im Vergleich zu den Aufnahmemessungen um den Faktor 1000 erhöht.

4.1.1.6 Expressionsanalyse der DctA-Varianten

Bereits einzelne Aminosäureaustausche können gravierende Auswirkungen auf die Eigenschaften von Proteinen haben. Diese gezielten Eingriffe in die Struktur und Funktionsfähigkeit der Proteine wurden in dieser Mutationsstudie genutzt, um den bifunktionalen Charakter des Transporters DctA genauer zu charakterisieren. Aminosäuresubstitutionen können aber ebenso die Expression und die Stabilität der Proteine beeinträchtigen. Deshalb war es essentiell die Expression der untersuchten DctA-Varianten zu überprüfen. So sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Eigenschaften das Resultat von fehlendem DctA waren.

Der Expressionsnachweis der His₆-DctA-His₆-Varianten wurde nach der Auftrennung von jeweils 20 µg Gesamtprotein durch SDS-PAGE und den Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit Hilfe von Penta-His-Antikörpern bewerkstelligt. Die Expression der DctA-Varianten erfolgte durch die pMW1194-Derivate im Stamm MDO800 (DctA-). Die Stämme wurden aerob bei 30 °C in LB Medium bis zur OD_{570nm} von 1,0 kultiviert und anschließend wurden die DctA-Varianten mit L-Arabinose (670 µM) für zwei Stunden induziert.

Bei allen acht untersuchten DctA-Varianten (Abb. E10: 3-10) konnte aus dem Gesamtprotein der Stämme His₆-DctA-His₆ in vergleichbarer Menge im Westernblot nachgewiesen werden. Das native Protein hat ein apparentes Laufverhalten von 37 kDa (Abb. E10: 2). Die Differenz zum berechneten Molekulargewicht von 50,3 kDa ist durch die starke Hydrophobizität des DctA-Proteins erklärbar (Witan 2012). Der DctA-defiziente Stamm MDO800 (Abb. E10: 1) weist keine Bande bei 37 kDa auf. Eine präzise Aussage über die Expressionsstärke der DctA-

Varianten ist aber nicht möglich, da die Expressionsnachweise von unterschiedlichen Westernblots stammen. Dennoch besaßen alle acht DctA-Varianten ein vergleichbares Expressionsniveau zu wildtypischem DctA bzw. zu wildtypischen DctA-Varianten, die auf demselben Immunoblot aufgetragen wurden. Eine Zusammenfassung aller Immunoblots für die Expressionsanalyse der DctA-Varianten befindet sich in Abb. A8 im Anhang.

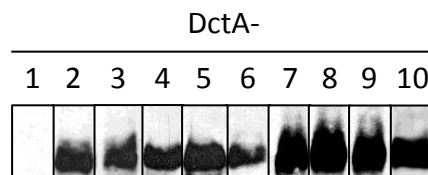


Abb. E10: Expressionsnachweis der DctA-Varianten. Der Stamm MDO800 wurde mit Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte aerob in LB Medium bei 30°C. Die Varianten von DctA wurden mit 670 µM L-Arabinose induziert. Pro Spur wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. DctA wurde mit Penta-His-Antikörper nachgewiesen. (1) DctA-: MDO800; (2) pDctA(Wt): pMW1194; (3) pDctA(N301A): pMW1945; (4) pDctA(S380A): pMW1866; (5) pDctA(S380D): pMW1868; (6) pDctA(S380I): pMW1867; (7) pDctA(S380N): pMW2159; (8) pDctA(S380Q): pMW2158; (9) pDctA(R383N): pMW2161; (10) pDctA(L414A): pMW1271

4.1.1.7 Interaktion der DctA-Varianten mit DcuS

Gemeinsam mit DctA bildet DcuS den DctA/DcuS-Sensorkomplex (Witan et al. 2012a; Witan et al. 2012b). Aufseiten von DctA konnte die cytoplasmatische Helix 8b als Interaktionsdomäne mit DcuS identifiziert werden. Das LX₄LX₃L-Motiv der amphipathischen Helix 8b mit Aminosäureresten L405, L410 sowie L414 spielt eine erhebliche Rolle für diese Wechselwirkung. Aminosäureaustausche an diesen Positionen mit Alanin führen zu Interaktionsverlusten mit DcuS im „bacterial two-hybrid“ (BACTH) System. Weitere Interaktionsschnittstellen im Bereich der Transmembranhelices stehen aber ebenfalls zur Debatte. Bei DcuS gilt die cytoplasmatische PAS_C-Domäne als aussichtsreichster Kandidat für die Interaktion mit Helix 8b (Witan et al. 2012a; Witan et al. 2012b; Monzel et al. 2013; Scheu unveröffentlicht).

Der Einfluss der vier Aminosäuresubstitutionen N301A, S380A, S380D und S380I auf die Heterodimerisierung mit DcuS wurde im BACTH-System (Karimova et al. 1998; 2005) untersucht. Diese Auswahl beinhaltet die beiden dysfunktionalen Varianten DctA(N301A) und DctA(S380I), die wildtypische Variante DctA(S380A) sowie die entkoppelte, „monofunktionale“ Regulationsvariante DctA(S380D). Die Protein-Protein Interaktionsmessungen in diesem Two-Hybrid System beruhen auf der funktionalen

Wiederherstellung der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* in einem *E. coli* Stamm. Die Adenylatcyclase setzt sich aus den Domänen T18 und T25 zusammen. Sie ist inaktiv, wenn entweder beide Domänen getrennt voneinander vorliegen oder sie sich durch sterische Effekte behindern. Kommt es jedoch zu Kontakt der Domänen oder liegen beide in räumlicher Nähe zueinander, sind sie in der Lage die Umsetzung von ATP zu cAMP zu katalysieren. Das gebildete cAMP steigert durch das „catabolite activator protein“ (CAP) unter anderem die Expression des *lac*-Operons. Diese Expressionssteigerung kann anhand von β -Galactosidase-messungen bestimmt werden. Das System bietet somit eine Methode, die Interaktion von Proteinen durch Fusionen mit T18 und T25 zu untersuchen.

Die Interaktion zwischen DcuS und DctA wurde mit den Kombinationen der Fusionen T25-DcuS mit T18-DctA bzw. T25-DctA mit T18-DcuS, die in Abbildung E11 beispielhaft dargestellt sind, ermittelt. Die DctA-Substitutionen N301A, S380A, S380D und S380I wurden in T18- und T25-DctA durch gerichtete Mutagenese der Plasmide pMW917 bzw. pMW856 eingefügt. Der *cydA*-defiziente Stamm BTH101 wurde mit den T18- und T25-Konstrukten komplementiert. Die Kultivierung erfolgte aerob in LB Medium bei 30°C. Die Fusionsprodukte wurden mit 0,5 mM IPTG exprimiert.

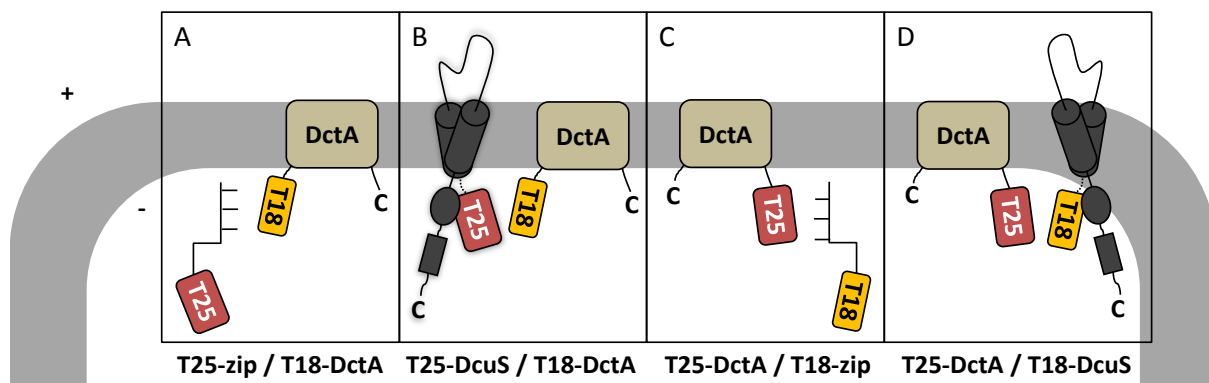


Abb. E11: Schematische Darstellung der BACTH Interaktionsmessungen von DctA-Varianten mit DcuS. (A) Kontrolle zur Hintergrundaktivität: T18-DctA (pMW917) und T25-zip (pKT25-zip). (B) Konstrukte zur Bestimmung der Heterodimerisierung von T18-DctA und T25-DcuS: T18-DctA (pMW917) und T25-DcuS (pMW426). (C) Kontrolle zur Hintergrundaktivität: T18-zip: (pUT18C-zip) und T25-DctA (pMW856). (D) Konstrukte zur Bestimmung der Heterodimerisierung von T18-DcuS und T25-DctA: T18-DcuS (pMW429) und T25-DctA (pMW856).

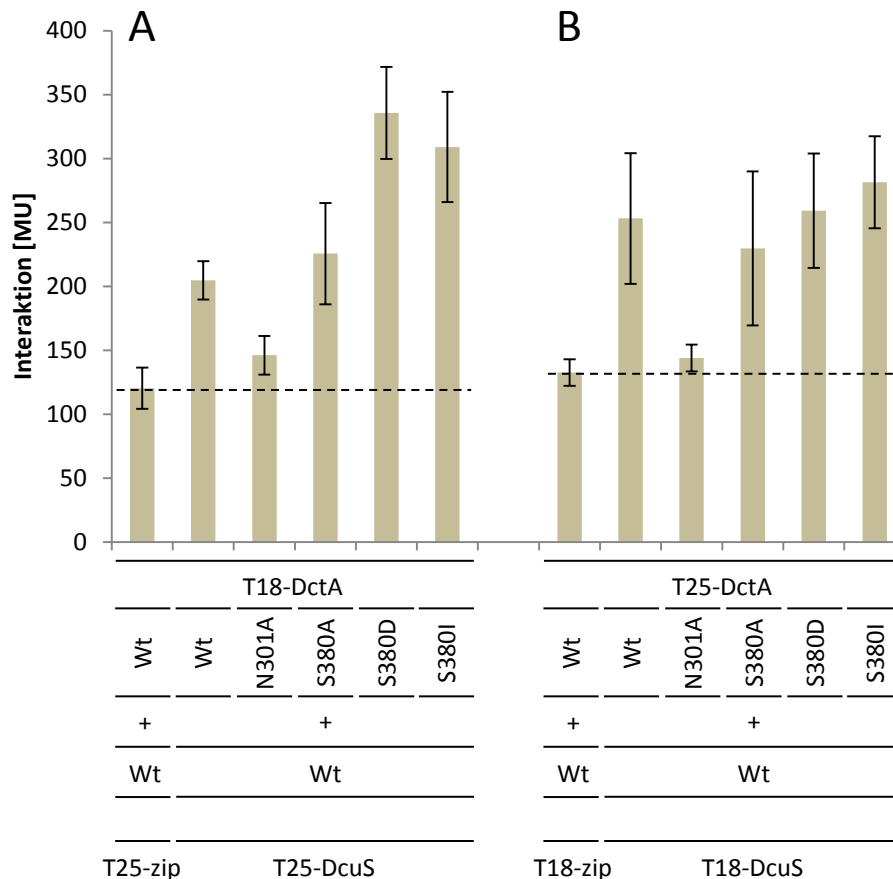


Abb. E12: Interaktion der Varianten von DctA mit DcuS im BACTH. Der Stamm BTH101 wurde mit Derivaten des Plasmids pMW917 (T18-DctA(Wt)) und pMW426 (T25-DcuS(Wt)) (A) oder mit Derivaten des Plasmids pMW856 (T25-DctA(Wt)) und pMW429 (T18-DcuS(Wt)) (B) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium bei 30°C. Die Varianten der Fusionsprodukte wurden durch 0,5 mM IPTG exprimiert. Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die gestrichelten Linien stellen den Schwellenwert für Interaktion dar. Diese wurden durch die Kombination von T18-DctA(Wt) mit T25-zip(Wt) (A) oder T18-zip(Wt) mit T25-DctA(Wt) (B) festgelegt. T18-Fusionen: T18-DctA(Wt): pMW917; T18-DctA(N301A): pMW2169; T18-DctA(S380A): pMW2172; T18-DctA(S380D): pMW2173; T18-DctA(S380I): pMW2174; T18-zip(Wt): pUT18C-zip; T18-DcuS(Wt): pMW429. T25-Fusionen: T25-zip(Wt): pKT25-zip; T25-DcuS(Wt): pMW426; T25-DctA(Wt): pMW856; T25-DctA(N301A): pMW2163; T25-DctA(S380A): pMW2165; T25-DctA(S380D): pMW2166; T25-DctA(S380I): pMW2167.

Die Interaktionen der Konstrukte T18-DctA(Wt) mit T25-DcuS(Wt) bzw. T25-DctA(Wt) mit T18-DcuS(Wt) dienen als Positivkontrollen für die Wechselwirkungen und als Vergleichswerte für die DctA-Varianten (Abb. E12). Die Kombinationen T18-DctA mit T25-zip und T25-DctA mit T18-zip, die nicht interagieren, bestimmen die Hintergrundaktivität und sind durch die gestrichelten Linien visualisiert. Von den vier untersuchten Varianten weist einzig DctA(N301A) eine verminderte Wechselwirkung mit DcuS auf. Beide getesteten Kombinationen T18-DctA(N301A) mit T25-DcuS sowie T25-DctA(N301A) mit T18-DcuS liegen im Bereich der Hintergrundaktivität der Negativkontrolle. Dieser Aminosäureaustausch in TM7 von DctA hat demnach einen schwerwiegenden Effekt auf die Interaktion mit DcuS. Die

Substitutionen S380A, S380D und S380I andererseits erreichen in beiden Kombinationsmöglichkeiten mindestens das Interaktionsniveau der wildtypischen Kontrollen. Bei den Ansätzen T18-DctA(S380D) mit T25-DcuS sowie T18-DctA(S380I) mit T25-DcuS ist die Wechselwirkung zu DcuS im Vergleich zur Positivkontrolle sogar noch einmal gesteigert. Diese DctA-Varianten wirken sich folglich positiv auf die Rekonstitution der Adenylatcyclase aus.

4.1.2 Vergleich der Substratspektren von DcuS und DctA

Der DctA/DcuS-Sensorkomplex weist zwei Bindestellen für C₄-Dicarbonsäure auf: Einerseits die periplasmatische PAS_P-Domäne der Sensor kinase DcuS (Pappalardo et al. 2003; Kneuper et al. 2005; Cheung & Hendrickson 2008) und andererseits die Bindetasche des Symporters DctA (Witan et al. 2012b). Ob nur eine oder beide Bindestellen als Eingangsstellen für die Effektorerkennung im DctA/DcuS-Sensorkomplex notwendig sind, ist nicht bekannt. Beim anaeroben Transporter DcuB konnten im Vergleich mit der Sensor kinase DcuS Unterschiede in den Substratspektren gezeigt werden (Wörner 2013). Die Substanzen Maleinat sowie Nitropropionat haben eine Expressionssteigerung des DcuSR-regulierten Reportergens *dcuB-lacZ* zur Folge, zeigen aber keine Hemmung der Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat durch DcuB.

Entsprechend den Untersuchungen zu DcuB wurden die Substratspektren von DctA und DcuS aufgenommen. Unterschiede sollen Hinweise auf die Verwendung der C₄-Dicarbonsäure Bindestellen für die Signalerkennung im DctA/DcuS-Sensorkomplex ermöglichen.

4.1.2.1 Effektorspezifität von DcuS

Die Sensor kinase DcuS detektiert Effektoren mit ihrer PAS_P Domäne und induziert die Expression ihrer Zielgene (Zientz et al. 1998; Golby et al. 1999). Die Effektorspezifität von DcuS wurde wie zuvor bei den Versuchen zu der regulatorischen Funktion der DctA-Varianten beschrieben (4.1.1.3), im DcuB-defizienten Stamm IMW503 in Anwesenheit von DctA bestimmt. DctA wurde erneut vom Plasmid pMW1194 induziert. Die Expression des Reportergens *dcuB-lacZ* wurde unter anaeroben Bedingungen anhand von β-

Galactosidasemessungen ermittelt. Deren Aktivität wurde zur Bestimmung der Güte der einzelnen Effektoren für DcuS verwendet.

Der Stamm IMW503 wurde mit dem Plasmid pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und DctA wurde mit L-Arabinose (50 μ M) induziert. Die Kulturen wurden anaerob in eM9-Medium mit Glycerin (50 mM) als Kohlenstoffquelle sowie DMSO (20 mM) als Elektronenakzeptor gezüchtet. Als Effektoren wurden 20 mM L-Malat, L-Aspartat, Fumarat, Citrat, Succinat und Maleinat hinzugefügt. Nitropropionat wurde nur in Konzentrationen von 10 mM eingesetzt, da sich höhere Konzentrationen toxisch auf die Zellen auswirken (Bock 2004).

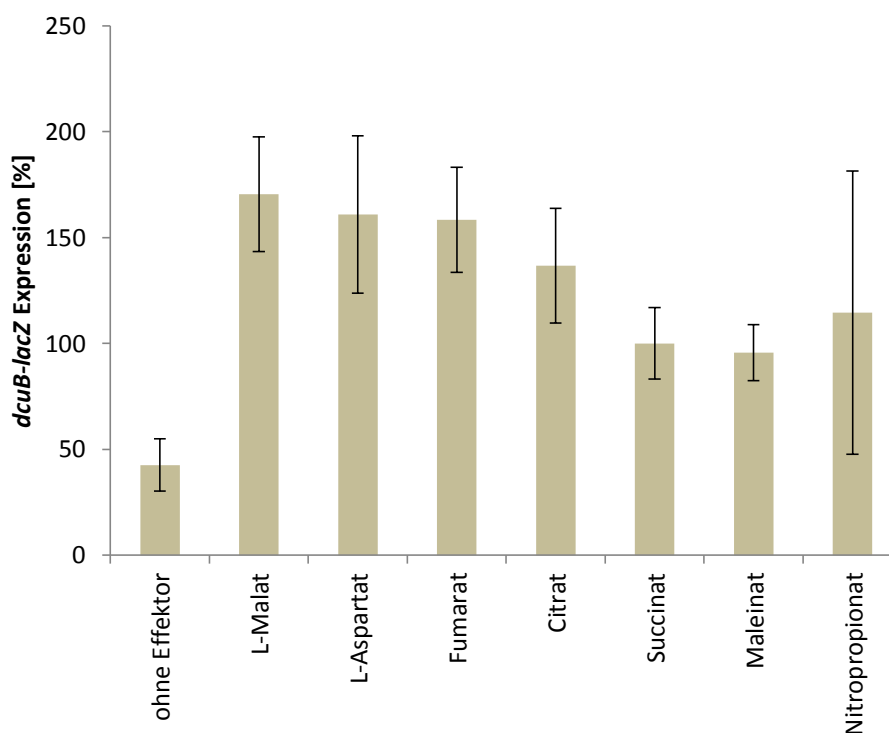


Abb. E13: Die Effektorspezifität von DcuS in dem DcuB-defizienten Stamm IMW503 in Anwesenheit von DctA. Der DcuB-defiziente Stamm IMW503 (DcuB-) wurde mit dem Plasmid pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μ M L-Arabinose induziert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die *dcuB-lacZ* Expression der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor. Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Effektoren dienten L-Malat, L-Aspartat, Fumarat, Citrat, Succinat, Maleinat jeweils mit 20 mM sowie Nitropropionat mit 10 mM. Die *dcuB-lacZ* Expression des Effektors Succinat wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. DcuB-: IMW503; pDctA(Wt): pMW1194

Die Effektorspezifität von DcuS im DctA/DcuS-Sensorkomplex ist in Abbildung E13 aufgeführt und ähnelt dem Substratspektrum von DcuS unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von DcuB (Kneuper et al. 2005). Alle sieben untersuchten Effektoren führen zu einer Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ* im Vergleich zu Kulturen ohne Effektor. Die

Reporterexpression des Stammes mit dem Effektor Succinat wurde zum Vergleich mit den folgenden Aufnahmemessungen von DctA mit [^{14}C]-Succinat auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte wurden dementsprechend standardisiert. L-Malat, L-Aspartat, Fumarat und Citrat erwiesen sich als die besten Effektoren für DcuS. Die Expressionen von *dcuB-lacZ* lag mit diesen Substraten deutlich über 100%. Die Substrate Maleinat und Nitropropionat hingegen erreichten lediglich das *dcuB-lacZ* Expressionsniveau des Effektors Succinat. Dennoch befand sich die Expression des Reportergens dieser Ansätze um den Faktor 2 über dem der Kulturen ohne Effektor. Die Messungen mit Nitropropionat wiesen hohe Schwankungen auf. Diese können auf die Toxizität von Nitropropionat auf die Zellen und das Wachstum dieser zurückgeführt werden. Des Weiteren wurde das Substratspektrum von DcuS in Gegenwart der entkoppelten Regulationsvariante DctA(S380D) aufgenommen (Abb. A9). Dieses gleicht dem von wildtypischem DctA und ist somit eine weitere Bestätigung dafür, dass die regulatorische Funktion in DctA(S380D) noch intakt ist.

4.1.2.2 Substratspektrum von DctA

Unter aeroben Bedingungen und in Anwesenheit von C_4 -Dicarbonsäuren induziert das DcuSR-System die Expression des Transporters DctA (Zientz et al. 1998; Golby et al. 1999). Dieser katalysiert die Aufnahme der C_4 -Dicarboxylate im Symport mit 2 Protonen (Kay & Kornberg 1969; Gutowski & Rosenberg 1975). Die C_4 -Dicarboxylate werden anschließend im Tricarbonsäurezyklus verstoffwechselt. Das Substratspektrum von DctA wurde anhand der Konkurrenz der Succinataufnahme durch die Substrate erstellt. Neben den bereits in der Literatur beschriebenen Transportsubstraten L-Malat, L-Aspartat, Fumarat und Succinat (Kay & Kornberg 1969), wurde die Inhibition der Aufnahme von [^{14}C]-Succinat durch Citrat, Maleinat und Nitropropionat untersucht. Für die Transportuntersuchungen wurden die Aufnahme von 50 μM [2,3- ^{14}C]-Succinat in Anwesenheit der Konkurrenten, die im zehnfachen Überschuss vorlagen, bestimmt. Die Messungen erfolgten im *E. coli* Stamm IMW237. Dieser besitzt ein chromosomales, wildtypisches *dctA* Gen. Die Kulturen wurden in eM9-Medium mit 50 mM Succinat als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle gezüchtet.

Die kompetitive Hemmung des Transports von [^{14}C]-Succinat durch die alternativen Substrate ist in Abbildung E14 angegeben. L-Malat, Fumarat sowie Succinat hemmen im zehnfachen Überschuss die Aufnahme von [^{14}C]-Succinat zu circa 85 %. Das Substrat L-

Aspartat zeigt mit 68,7 % ebenfalls eine starke Inhibition der [^{14}C]-Succinataufnahme. Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, dass diese C_4 -Dicarbonsäuren sowie die Aminosäure Aspartat mit hoher Affinität an DctA binden und transportiert werden. Die Kompetitoren Citrat, Maleinat sowie Nitropropionat andererseits inhibieren die Aufnahme von [^{14}C]-Succinat nicht oder nur geringfügig. Sie kompetieren damit nur schlecht mit [^{14}C]-Succinat an der Bindestelle von DctA. Damit weist DctA für diese Substrate eine andere Spezifität als DcuS auf: Die Effektoren Citrat, Maleinat und Nitropropionat führen zu einer deutlichen Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ*.

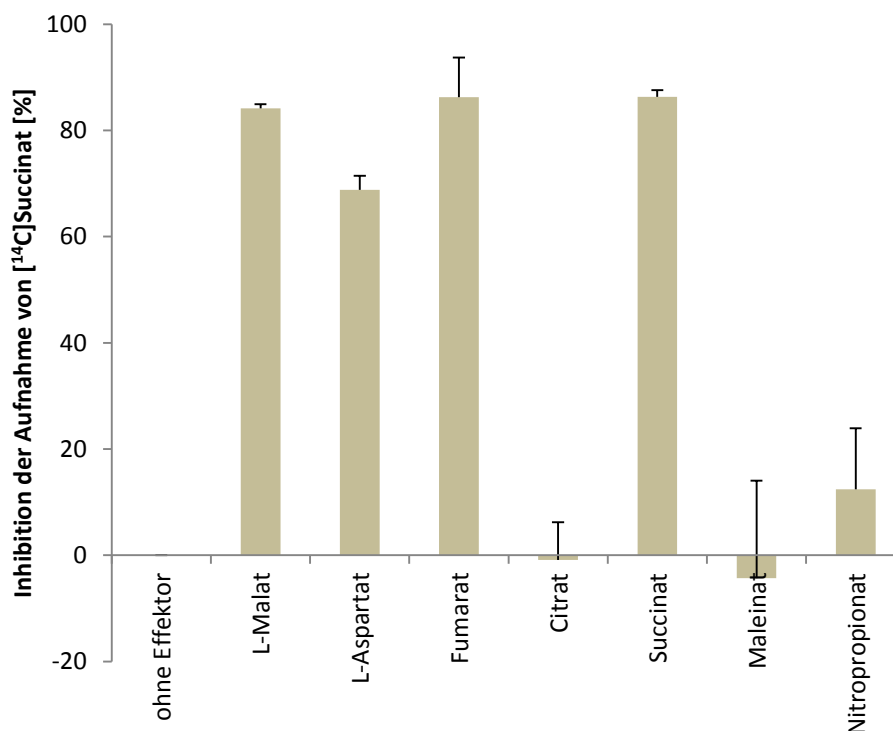


Abb. E14: Kompetitoren der Aufnahme von [^{14}C]-Succinat. Die Kultivierung des Stammes IMW237 (Wt) erfolgte unter aeroben Bedingungen in eM9-Medium mit 50 mM Succinat als Wachstumssubstrat. Die Kompetitionsmessungen wurden mit 50 μM [^{14}C]-Succinat durchgeführt. Die Kompetitoren lagen mit 500 μM im zehnfachen Überschuss vor. Die Aufnahme von [^{14}C]-Succinat wurde auf 0% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die Messungen wurden durch [REDACTED] durchgeführt.

4.1.2.3 Auswirkung der Citrat-, Maleinat- und Nitropropionatkonzentration auf die Aufnahme von [^{14}C]-Succinat

Bei dem Vergleich der Substratspektren von DcuS und DctA, stechen die Substanzen Citrat, Maleinat und Nitropropionat heraus. Einerseits führen sie zu einer eindeutigen Steigerung des DcuSR-regulierten Reportergens *dcuB-lacZ*. Andererseits wirken sie nur minimal bzw. nicht als Kompetitoren für die Aufnahme von [^{14}C]-Succinat durch DctA. Die Konzentrationen

der Effektoren bzw. Kompetitoren unterschieden sich in den Untersuchungen zu den Substratspektren von DcuS und DctA jedoch immens. So betrug die Effektorkonzentration bei den *dcuB-lacZ* Messungen 20 mM bzw. 10 mM. Bei den Transportmessungen hingegen wurden 500 μM der Kompetitoren eingesetzt. Aufgrund dieser 40- bzw. 20-fach höheren Konzentration der Substrate im Induktionsexperiment sollte für die drei Verbindungen Citrat, Maleinat und Nitropropionat die Konkurrenz bei Konzentrationen getestet werden, die den Induktionsbedingungen (20 bzw. 10 mM) entsprachen. Die Aufnahme von $[2,3-^{14}\text{C}]$ -Succinat wurde mit ansteigenden Kompetitorkonzentrationen (0-20 mM bzw. 0-10 mM) in Stamm IMW237 untersucht.

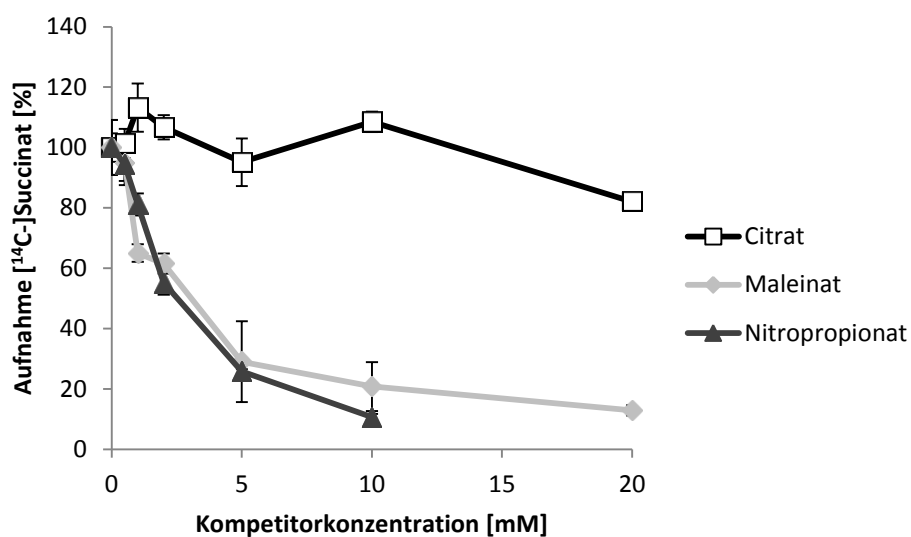


Abb. E15: Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -Succinat in Abhängigkeit steigender Citrat-, Maleinat- und Nitropropionatkonzentrationen. Die Kultivierung des Stammes IMW237 (Wt) erfolgte unter aeroben Bedingungen in eM9-Medium mit 50 mM Succinat als Wachstumssubstrat. Die Aufnahmemessungen wurden mit 50 μM $[^{14}\text{C}]$ -Succinat und zunehmender Kompetitorkonzentrationen (0-20 mM) durchgeführt. Die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -Succinat des Stammes IMW237 wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die Messungen wurden durch [REDACTED] durchgeführt.

Abbildung E15 stellt die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -Succinat mit steigender Konzentration der Kompetitoren Citrat, Maleinat und Nitropropionat dar. Die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -Succinat in Abwesenheit der Kompetitoren wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte dementsprechend standardisiert. Kompetitorkonzentrationen, die bei den *dcuB-lacZ* Messungen zur Bestimmung der Effektorspezifität von DcuS verwendet wurden, zeigen im Fall von Maleinat (20 mM) und Nitropropionat (10 mM) eine beträchtliche Hemmung der $[^{14}\text{C}]$ -Succinataufnahme von 87 % bzw. 89 %. Im Gegensatz dazu inhibiert die Tricarbonsäure Citrat bei Konzentrationen von 20 mM den $[^{14}\text{C}]$ -Succinattransport lediglich um 18 %.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Citrat ein guter Effektor vom DctA/DcuS-Sensorkomplex ist, DctA allerdings nur geringfügige Affinität für Citrat besitzt.

4.1.3 Titration von DctA als Koregulator des DctA/DcuS-Sensorclusters

Bakterielle Sensorsysteme, wie zum Beispiel Zweikomponentensysteme, benötigen häufig Hilfsproteine um ihre sensorische Funktion zu erfüllen (Tetsch & Jung 2009; Buelow & Raivio 2010). Für DcuSR aus *E. coli* ist die Anwesenheit von DctA notwendig, damit das System auf C₄-Dicarbonsäuren ansprechbar ist (Davies et al. 1999; Witan et al. 2012a). Um ein besseres Verständnis für die Auswirkung von DctA auf die Funktion von DcuS im DctA/DcuS-Sensorkomplex zu bekommen, wurde der Einfluss ansteigender DctA- und Fumaratkonzentrationen auf die *dcuB-lacZ* Expression untersucht. Die Expression von *dcuB-lacZ* wurde unter anaeroben Bedingungen im Reporterstamm IMW503 (DcuB-), wie bereits zuvor beschrieben (4.1.1.3 und 4.1.2.1), anhand von β -Galactosidasemessungen bestimmt. DctA wurde zu unterschiedlichen Mengen vom Plasmid pMW1194 (pDctA(Wt)) produziert. Die DctA-Konzentrationen wurden anhand von Penta-His-Antikörpern nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran analysiert.

Die Kulturen wurden in eM9-Medium in Anwesenheit der Kohlenstoffquelle Glycerin (50 mM) und des Elektronenakzeptors DMSO (20 mM) gezüchtet. Die Expressionsstärke von DctA wurde durch L-Arabinose (0-100 μ M) variiert bzw. durch Glucose (100 μ M) unterdrückt. Ansteigende Fumaratkonzentrationen (0-20 mM) dienten als Effektor für DcuSR.

Abbildung E16A zeigt die *dcuB-lacZ* Expression als Produkt der variierenden DctA- und Fumaratkonzentrationen. In Abwesenheit von Fumarat sorgen steigende DctA-Mengen für die Abnahme der *dcuB-lacZ* Reporterexpression. Eine höhere DctA-Konzentration führt demnach zur Steigerung des funktionsbereiten oder Fumarat-sensitiven Anteils von DcuS in den Zellen. Ferner steigt die *dcuB-lacZ* Expression aller Kurven erst ab Fumaratkonzentrationen von 50 μ M über das basale Niveau an. Die maximale Expression des Reportergens *dcuB-lacZ* wurde ausnahmslos bei 5 mM Effektorkonzentration erreicht und die halbmaximalen Expressionslevels der jeweiligen Stämme liegen im Bereich von 0,5 - 1 mM. Der Westernblot in Abbildung E16B zeigt, dass DctA-Konzentrationen durch L-

Arabinose gut steuerbar sind. Die Stämme, die ohne L-Arabinose gezüchtet wurden, wiesen nur wenig DctA im Zellhomogenat auf. Die DctA-Produktion konnte durch steigende L-Arabinosekonzentrationen erhöht bzw. durch Glucose verringert werden.

Es lässt sich festhalten, dass der funktionsbereite Zustand von DcuS einzig durch die DctA-Konzentration beeinflusst wird. Die maximale Expression von *dcuB-lacZ* andererseits wurde in allen Stämmen bei der gleichen Fumaratkonzentration (5 mM) erreicht und ist somit unabhängig von der DctA-Konzentration. Die maximale Induktion von DcuSR ist demnach unabhängig von der Transportaktivität von DctA. Diese Ergebnisse konnten mit analogen Titrationsuntersuchungen mit der entkoppelten Regulationsvariante DctA(S380D) bestätigt werden (Abb. A11). Bei dieser transport-defizienten Variante konnte ebenfalls die Unabhängigkeit der maximalen Induktion von DcuSR von der Transporterkonzentration gezeigt werden. Der funktionsbereite Zustand war auch hier von der Konzentration von DctA(S380D) abhängig.

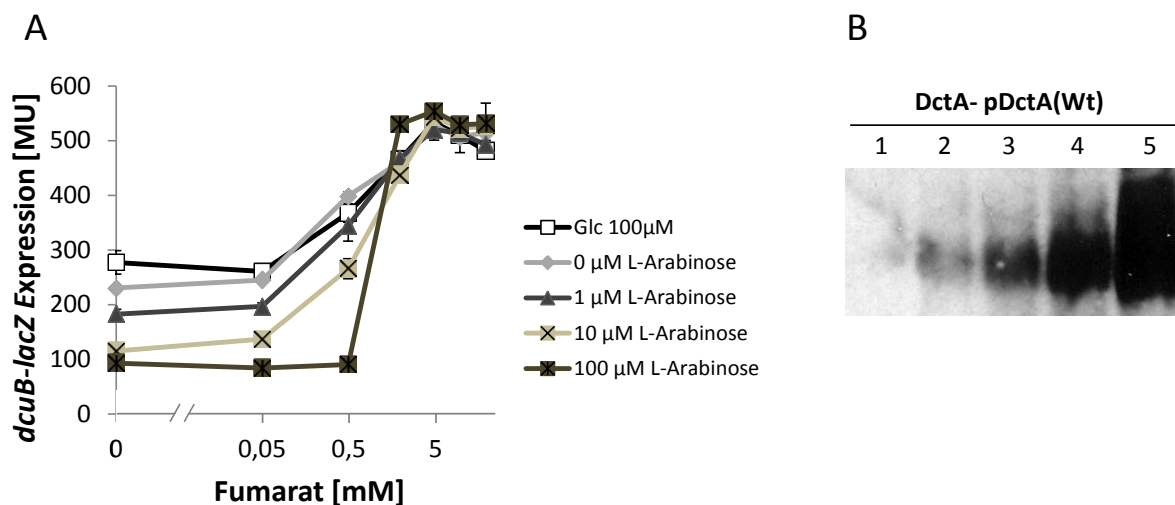


Abb. E16: Titration von pDctA(Wt) als Koregulator von DcuS. (A) Die Effekte von zunehmender DctA Expressionsstärke sowie steigender Fumaratkonzentrationen auf die *dcuB-lacZ* Expression in IMW503 (DcuB-) wurden durch β -Galactosidaseaktivitätsmessungen untersucht. Der DcuB-defiziente Stamm IMW503 (DcuB-) wurde mit dem Plasmid pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert. DctA wurde durch unterschiedliche L-Arabinosekonzentrationen (0-100 μ M) induziert oder durch Glucose (100 μ M) reprimiert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor. Fumarat (0-20 mM) diente als Effektor. Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. (B) Westernblot-Analyse der zunehmenden DctA-Konzentrationen. Pro Spur wurden 64 μ g Gesamtprotein aufgetragen. DctA wurde mit Penta-His-Antikörper nachgewiesen und folgendermaßen exprimiert: (1) 100 μ M Glucose; (2) 0 μ M L-Arabinose; (3) 1 μ M L-Arabinose; (4) 10 μ M L-Arabinose; (5) 100 μ M L-Arabinose. DcuB-: IMW503; pDctA(Wt): pMW1194

4.2 Die Transmembrandomänen von DcuS

Der Sensor DcuS liegt als Oligomer in der Membran vor und seine Domänenstruktur wurde bereits ausführlich untersucht (Scheu et al. 2010a; Scheu et al. 2010b). Neben der Homooligomerisierung interagiert DcuS noch mit den Transportern DcuB und DctA (Witan et al. 2012a). Die Anwesenheit eines der beiden Transporter ist für den Funktionszustand von DcuSR essentiell (Davies et al. 1999; Kleefeld et al. 2009; Witan et al. 2012a). Diese ermöglichen durch ihre Gegenwart die Detektion von C₄-Dicarbonsäuren durch DcuS.

Die PAS-Domänen PAS_p und PAS_c, sowie die Histidinkinase wurden bereits eingehend analysiert und deren Funktionen für DcuS sind größtenteils bekannt (Pappalardo et al. 2003; Kneuper et al. 2005; Cheung & Hendrickson 2008; Etkorn et al. 2008; Monzel et al. 2013; Kneuper et al. 2010). Im Gegensatz dazu ist für die beiden Transmembranhelices 1 und 2 lediglich ihre flankierende Lage zur periplasmatischen PAS_p, sowie deren Sequenz bekannt. Die Forschung an Membranproteinen der letzten 30 Jahre hat gezeigt, dass Transmembrandomänen mehr als nur reine Membrananker darstellen. So können Transmembranhelices durch unterschiedliche Bewegungen Signale über die Membran leiten oder als Schnittstellen für intra- bzw. intermolekulare Wechselwirkungen dienen. Bei den folgenden Untersuchungen sollte die Funktion der beiden Transmembranhelices von DcuS untersucht werden. Dabei sollte die Rolle der Transmembrandomänen für die Interaktion im DcuS-Oligomer und die Funktion von TM2 für die Signaltransduktion ermittelt werden. Geeignete Orte für Funktionsmutanten der TMs von DcuS wurden anhand von Sequenzanalysen identifiziert und mittels gerichteter Mutagenese erstellt.

4.2.1 Funktion der Transmembrandomänen TM1 und TM2

4.2.1.1 Sequenzanalyse von TM1 und TM2

Sequenzmotive des GxxxG- bzw. SmallxxxSmall-Typs, bei denen zwei Aminosäuren mit kleinen Seitenketten wie Glycin, Alanin oder Serin, durch drei weitere Aminosäuren getrennt werden, treten unverhältnismäßig oft in α -Helices auf (Kleiger et al. 2002). Vor allem kommen diese aber in Transmembranhelices vor und dienen dort als Rahmen für Dimerisierung (Senes et al. 2000; Russ & Engelman 2000). Als weitere Dimerisierungsmotive für Transmembrandomänen konnten einerseits Motive mit polaren Aminosäuren wie das

QxxS-Motiv beim Methyl-akzeptierenden Chemotaxisprotein Tar identifiziert werden (Sal-Man et al. 2004). Andererseits wurden Leucinzipper-ähnliche Motive beschrieben (Gurezka et al. 1999).

Die DcuS Sensorkinasen aus *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* sowie die DcuS-homologen Sensoren DctS aus *Bacillus subtilis* und *Geobacillus kaustophilus* gehören zur Familie der CitA-Histidinkinasen (Zientz et al. 1998; Scheu et al. 2010b; Graf 2009). Die Domänenstruktur von CitA-Histidinkinasen zeichnet sich durch das Vorhandensein einer periplasmatischen PAS_p-Domäne, die durch zwei Transmembranhelices flankiert ist, sowie einer anschließenden cytoplasmatischen PAS_c-Domäne und einer C-terminalen Kinasedomäne aus (Scheu et al. 2010b). Für den DcuS-verwandten Sensor CitA aus *K. pneumoniae* wird für den Signaltransfer vom Periplasma zum Cytoplasma eine Kolbenhubbewegung von TM2 nach Bindung des Effektors Citrat vorhergesagt (Sevana et al. 2008). Aufgrund der vergleichbaren Eigenschaften und Strukturen der Histidinkinasen DcuS und CitA sowie SCAM-Zugänglichkeitsstudien wird bei DcuS ebenfalls von einer vektoriellen Verschiebung der TM2 ausgegangen (Scheu et al. 2010b; Monzel unveröffentlicht). Anhand eines multiplen Sequenzvergleichs der Transmembranhelices von Sensorkinasen der CitA-Familie, sollten potentielle Mutationsorte für die Funktionsuntersuchungen der Transmembrandomänen 1 und 2 von DcuS identifiziert werden.

Abbildung E17 zeigt den Sequenzvergleich der Transmembrandomänen von DcuS-homologen und CitA-Sensoren aus verschiedenen Organismen. Die Sequenzen der Transmembranhelices der jeweiligen Sensoren wurden anhand der Transmembrandomänenvorhersage des TMHMM Server v. 2.0 bestimmt. Die Sequenzmotive des SmallxxxSmall-Typs sind hervorgehoben. Die Alignments offenbaren, dass der Anteil der konservierten Aminosäuren in TM1 und TM2 aller Sensoren sehr gering ist. In den CitA-Sensoren treten deutlich weniger Sequenzmotive des SmallxxxSmall-Typs auf im Vergleich zu den DcuS-Sensoren. Diese kommen lediglich in TM2 der CitA-Histidinkinasen aus *Escherichia coli* und *Geobacillus thermodenitrificans* vor. Die DcuS-homologen Histidinkinasen hingegen weisen mindestens eines dieser Sequenzmotive pro Transmembranhelix auf. Besonders in TM2 dieser Sensoren sind etliche dieser Sequenzmotive vertreten. Außerdem erwähnenswert sind die QxxS-Motive der TM2 von

CitA aus *K. pneumoniae* und *Salmonella typhi*. Zur Funktionsuntersuchung der TMs von DcuS aus *E. coli* wurden das AxxxS-Motiv von TM1 und das SxxxGxxxG-Tandemmotiv von TM2 als interessante Kandidaten für Substitutionen ausgewählt. Dabei galt dem SxxxGxxxG-Motiv und dessen Umgebung besondere Aufmerksamkeit, da bei synthetischen Transmembrandomänen, die ebenfalls dieses Sequenzmotiv besitzen, hohes Dimerisierungspotential nachgewiesen wurde (Russ & Engelman 2000). Ein Sequenzvergleich dieser künstlichen Transmembrandomänen der Bibliothek LEULIB mit TM2 von DcuS befindet sich in Abbildung A13 im Anhang.

A	DcuS-TM1_ECOLI	TVILMVSA VLFSV LLVVHLLIYFS	42	
	DcuS-TM1_KLEPN	STAV SLMIGSV IGAVLLLVYALW	42	
	DctS-TM1_BACSU	TILSYILVIF SFLIG GIVLIGNI	35	
	DctS-TM1_GEOKA	ILIFAIVSF SMLLS GVVFIISDFE	34	
	CitA-TM1_KLEPN	---IFLLILFTSTIVMLAMSWYL-	43	
	CitA-TM1_SALTI	----FLLILFTSTIVMLAITWYLT	39	
	CitA-TM1_ECOLI	-LRIFLLILVFSIFVIAALAQYFT	42	
	CitA-TM1_GEOTN	QTRLMVIICSLLLFVVIIFLTFLE-	26	
	B	DcuS-TM2_ECOLI	IIW SVLFG MLVGLIGTCILVKVL	205
		DcuS-TM2_KLEPN	VLLTILFS ALVCA LGTSLSV---	204
DctS-TM2_BACSU		IAFIVVLT LGFLAGS FLLA---	193	
DctS-TM2_GEOKA		AAV AVVLS LVV GGIGAWLLAS --	193	
CitA-TM2_KLEPN		W LSLQ ISSLLIPMAIMLLLLLFC-	200	
CitA-TM2_SALTI		WLN LQ ISSLLFPMAILLLVLLYC-	195	
CitA-TM2_ECOLI		-LLPMAGVFVLL GILMLLSWFLA	202	
CitA-TM2_GEOTN		--IFFFSV LALLFGAVGAVAIA --	188	

Abb. E17: Sequenzalignment der Transmembranhelices 1 und 2 von Histidinkinasen der CitA-Familie. Die Aminosäuresequenz der einzelnen Proteine wurde aus der UniProt Datenbank entnommen und mit Hilfe des TMHMM Server v. 2.0 wurden die Transmembrandomänen bestimmt. Die Aminosäuresequenzen wurden mit CLUSTALW (Larkin et al. 2007) verglichen. Sequenzmotive des SmallxxxSmall-Typs sind hervorgehoben. A: Sequenzvergleich der Transmembranhelix 1. B: Sequenzvergleich der Transmembranhelix 2. ECOLI: *Escherichia coli*; KLEPN: *Klebsiella pneumoniae*; BACSU: *Bacillus subtilis*; GEOKA: *Geobacillus kaustophilus*; SALTI: *Salmonella typhi*; GEOTN: *Geobacillus thermodenitrificans*

4.2.1.2 Strukturmodelle der Transmembranhelices 1 und 2

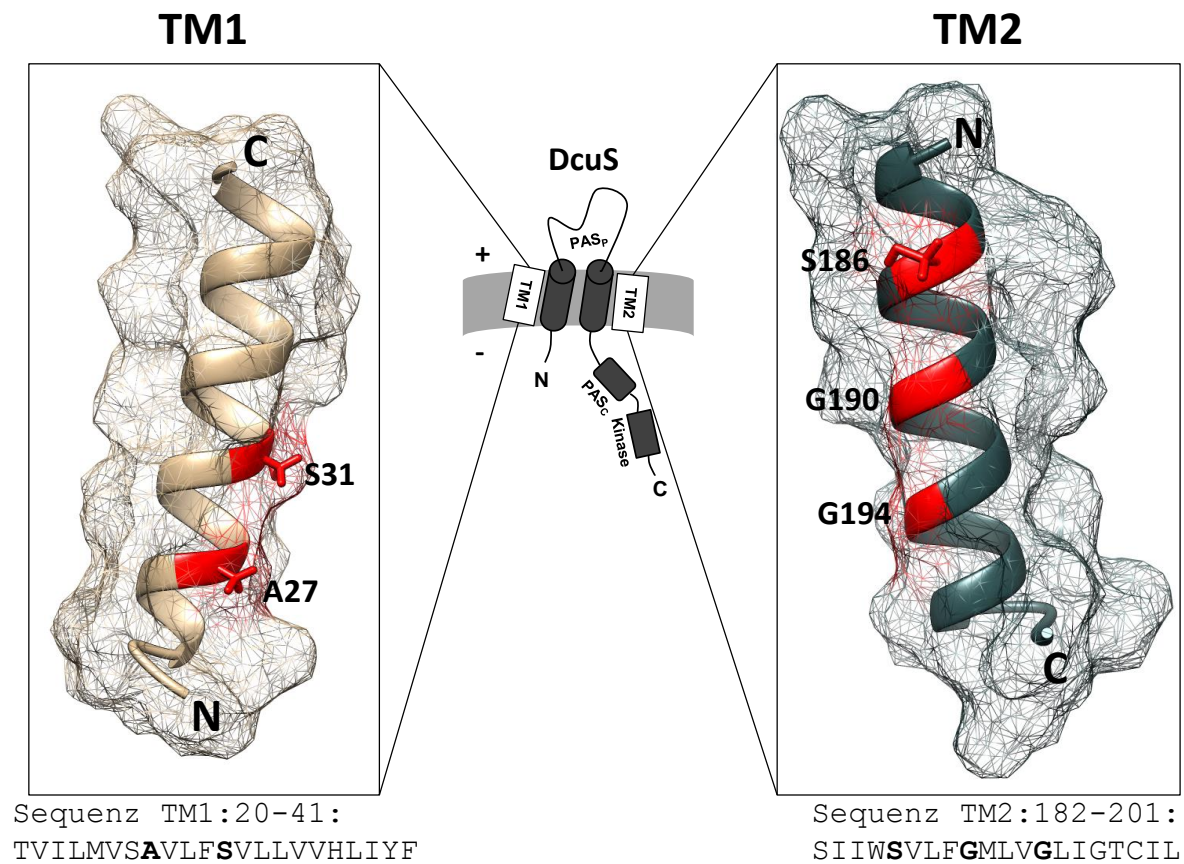


Abb. E18: Strukturmodelle der Transmembrandomänen TM1 und TM2. Die 3D-Strukturen der beiden Transmembranhelices wurden durch die *ab initio* Proteinstrukturvorhersage QUARK ONLINE (Xu & Zhang 2012) vorhergesagt und mit UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) dargestellt. Sequenzmotive des SmallxxxSmall-Typs sind rot dargestellt. Die Primärsequenzen von TM1 (beige) und TM2 (dunkelgrün) basierend auf experimentellen Daten (Monzel unveröffentlicht) sind angegeben. Die unterstrichenen Aminosäuren wurden mittels gerichteter Mutagenese substituiert.

Strukturmodelle der Helices TM1 und TM2 von DcuS sind in Abbildung E18 dargestellt. Die 3D-Strukturen der beiden TMs wurden mit Hilfe des Proteinstrukturvorhersage Servers QUARK ONLINE (Xu & Zhang 2012) berechnet und mit dem Programm UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) visualisiert. Rot hervorgehoben sind die Aminosäurereste der SmallxxxSmall-Sequenzmotive beider Transmembranhelices. Anhand dieser Strukturen lässt sich die Lage der Sequenzmotive darstellen. Die Aminosäuren der SmallxxxSmall-Motive liegen auf einer Helixseite und ihre Seitenketten bilden gemeinsame Oberflächen. Unterhalb der Strukturmodelle sind die Primärsequenzen der membranintegralen Bereiche von TM1 und TM2, die durch Zugänglichkeitsstudien bestimmt wurden, angegeben (Monzel unveröffentlicht). Die experimentellen Vermessungen von TM1 und TM2 stimmen bis auf wenige Ausnahmen mit der Transmembrandomänenvorhersage des TMHMM Server v. 2.0

überein. Die Positionen der Aminosäuren, die für die Funktionsstudien des GxxxG-Motivs substituiert wurden, sind durch den Unterstrich gekennzeichnet. Insgesamt wurden 19 Substitutionen an 16 Positionen durchgeführt. Die meisten Austausche wurden in TM2 getätigt, da diese einerseits am Signaltransfer vom Periplasma ins Cytoplasma beteiligt ist und andererseits das SxxxGxxxG-Tandemmotiv aufweist. Die Aminosäureaustausche in den TMs von DcuS wurden anhand von zielgerichteter Mutagenese des Plasmids pMW181 (Janausch et al. 2002b) realisiert. In diesem Expressionsvektor steht das *dcuS* Gen unter der Kontrolle seines wildtypischen Promoters.

4.2.1.3 Funktionsuntersuchungen zu TM1- und TM2-Varianten

Der Funktionszustand der TM1- und TM2-Varianten von DcuS wurde im Stamm IMW260 (Zientz et al. 1998) mit Derivaten des Expressionsvektors pMW181 (Janausch et al. 2002b) anhand von β -Galactosidasemessungen von *dcuB-lacZ* verifiziert.

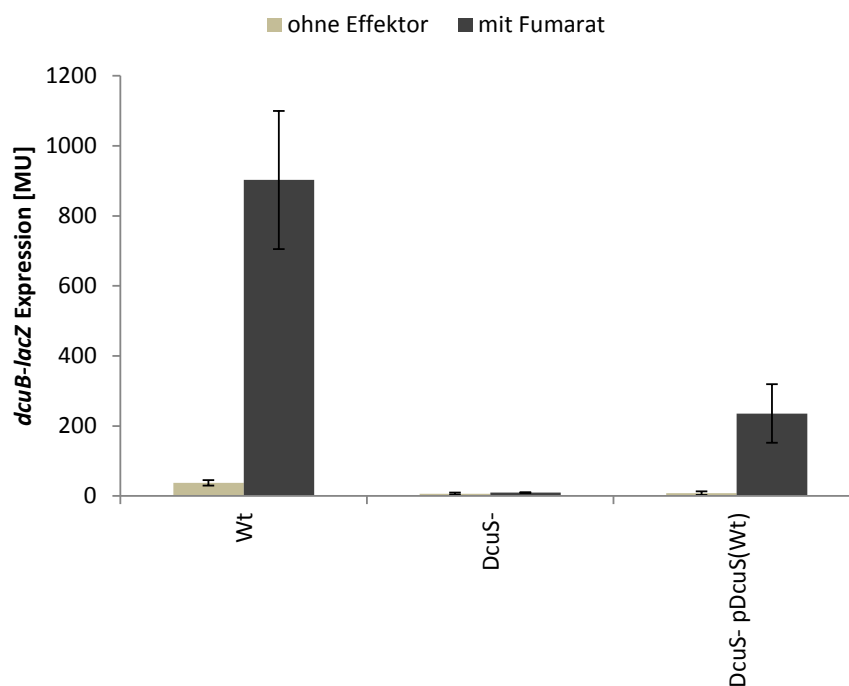


Abb. E19: Funktionskomplementation des DcuS-defizienten Stammes IMW260. Die Kulturen wurden anaerob in eM9-Medium bis in die exponentielle Wachstumsphase gezüchtet und anschließend wurde die Expression von *dcuB-lacZ* anhand der β -Galactosidaseaktivität bestimmt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige Balken). Des Weiteren wurde 20 mM Fumarat als Effektor für das DcuS/DcuR-System verwendet (dunkelgraue Balken). Als Positivkontrolle diente *E. coli* Stamm IMW237 (Wt). Wt: IM237; DcuS-: IMW260; pDcuS(Wt): pMW181

In Abbildung E19 ist die Komplementation des DcuS-defizienten Stammes IMW260 (DcuS-) mit dem Expressionsplasmid pMW181 (pDcuS(Wt)) dargestellt. Der Stamm IMW237 (Wt) dient hier als Positivkontrolle. Er besitzt ein chromosomales, wildtypisches *dcuS* Gen sowie eine *dcuB-lacZ* Reporterfusion. Die Anwesenheit des Effektors Fumarat führt bei diesem Stamm zu einer Steigerung der Expression von *dcuB-lacZ* um den Faktor 24. Beim DcuS-defizienten Stamm IMW260 (DcuS-) hingegen ist sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Fumarat nur eine Hintergrundexpression von *dcuB-lacZ* messbar. Der komplementierte Stamm IMW260 pMW181 (DcuS- pDcuS(Wt)) weist ein ähnliches Expressionsmuster wie Stamm IMW237 auf. Fumarat führt ebenfalls zur Steigerung der Reporterexpression um den Faktor 24. Der Stamm erreicht jedoch nur etwa ein Viertel der maximalen Expression von IMW237 (Wt). Dennoch spricht das DcuSR-System noch auf seine Effektoren an und diese Komplementation kann zur Bestimmung des Funktionszustandes von DcuS-Varianten verwendet werden.

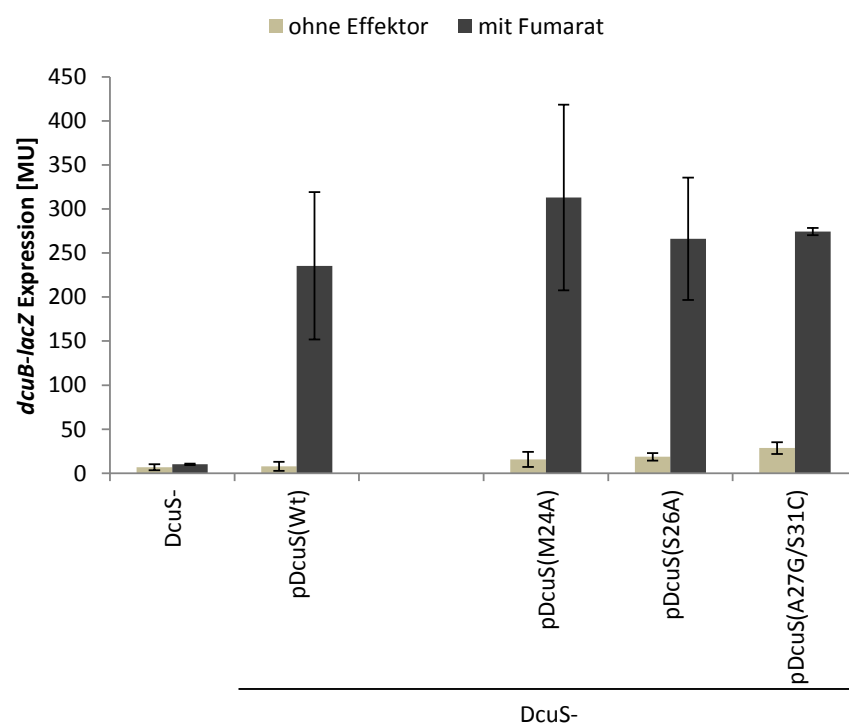


Abb. E20: *dcuB-lacZ* Reporterexpressionen von DcuS-TM1-Varianten. Der DcuS-defiziente Stamm IMW260 (DcuS-) wurde mit Derivaten des Plasmids pMW181 (pDcuS(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die Expression von *dcuB-lacZ* der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige Balken). 20 mM Fumarat wurde als Effektor benutzt (dunkelgraue Balken). DcuS-: IMW260; pDcuS(Wt): pMW181; pDcuS(M24A): pMW776; pDcuS(S26A): pMW777; pDcuS(A27G/S31C): pMW849

Die Messungen zur Funktion der DcuS TM1- und TM2-Varianten sind in Abbildungen E20 und E21 zusammengefasst. Für TM1 wurden die Substitutionen von M24A, S26A sowie der Doppelaustausch A27G/S31C des AxxxS-Motivs analysiert (Abb. E20). Die Expressionsmuster der drei Varianten DcuS(M24A), DcuS(S26A) und DcuS(A27G/S31C) gleichen dem von Stamm IMW260 komplementiert mit pMW181 (DcuS- pDcuS(Wt)). In Gegenwart des Effektors Fumarat kommt es zur Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ* im Vergleich zu den Ansätzen ohne den Effektor. Diese Aminosäureaustausche besitzen offensichtlich keine Auswirkung auf die Funktion von DcuS.

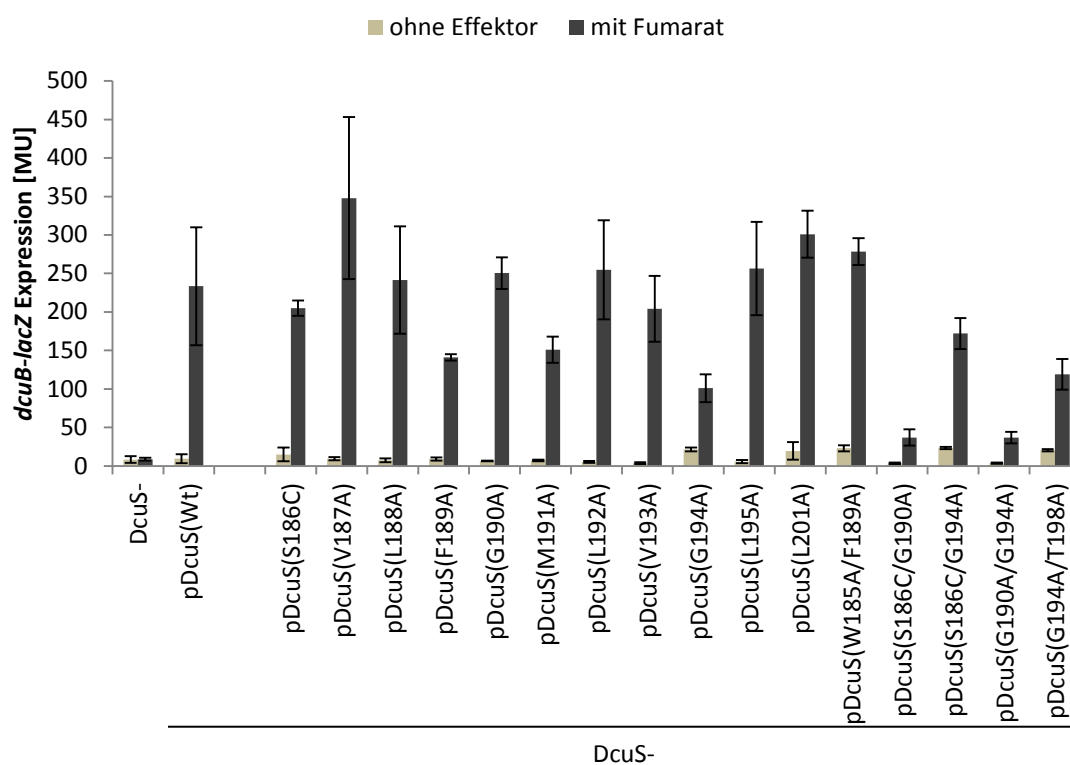


Abb. E21: *dcuB-lacZ* Reportergergenmessungen von DcuS-TM2-Varianten. Der DcuS-defiziente Stamm IMW260 (DcuS-) wurde mit Derivaten des Plasmids pMW181 (pDcuS(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die Expression von *dcuB-lacZ* der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige Balken). 20 mM Fumarat wurde als Effektor benutzt (dunkelgraue Balken). DcuS-: IMW260; pDcuS(Wt): pMW181; pDcuS(S186C): pMW827; pDcuS(V187A): pMW1203; pDcuS(L188A): pMW1204; pDcuS(F189A): pMW779; pDcuS(G190A): pMW819; pDcuS(M191A): pMW851; pDcuS(L192A): pMW1205; pDcuS(V193A): pMW1206; pDcuS(G194A): pMW841; pDcuS(L195A): pMW1207; pDcuS(L201A): pMW778; pDcuS(W185A/F189A): pMW852; pDcuS(S186C/G190A): pMW809; pDcuS(S186C/G194A): pMW1426; pDcuS(G190A/G194A): pMW813; pDcuS(G194A/T198A): pMW853

Bei den DcuS-Varianten der Transmembranhelix 2 hat die Mehrheit der Substitutionen ebenfalls keinen oder nur einen minimalen Effekt auf den Funktionszustand von DcuS (Abb. E21). Alle untersuchten DcuS-Varianten zeigen eine Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ*

über das basale Hintergrundniveau in Gegenwart des Effektors Fumarat. Die maximale Expressionsstärke in Anwesenheit von Fumarat unterscheidet sich jedoch bei einigen Varianten massiv. So beträgt die Reporterexpression mit dem Effektor bei den Varianten DcuS(G194A) und DcuS(G194A/T198A) lediglich die Hälfte der wildtypischen Kontrolle pMW181 mit IMW260 (DcuS- pDctA(Wt)). In diesen Varianten ist die Funktion von DcuS merklich beeinträchtigt. Einen noch größeren Einfluss auf die Funktion von DcuS haben die Substitutionen S186C/G190 und G190A/G194A. Die Stimulation der Expression von *dcuB-lacZ* durch den Effektor Fumarat beträgt in diesen Varianten im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle nur noch ein Sechstel. Interessanterweise werden bei den beeinträchtigten Varianten DcuS(G194A), DcuS(G194A/T198A), DcuS(S186C/G190A) und DcuS(G190A/G194A) stets mindestens eine Position des SxxxGxxxG-Motivs der TM2 substituiert. Die Varianten DcuS(S186C/G190A) und DcuS(G190A/G194A), bei denen jeweils zwei benachbarte Positionen des SxxxGxxxG-Sequenzmotivs substituiert sind, wurden aufgrund ihrer gravierenden Auswirkungen auf die Funktion von DcuS in weiteren Untersuchungen ausführlicher charakterisiert.

4.2.1.4 Einfluss von DcuS-OFF- bzw. DcuS-ON-Varianten in Kombination mit DcuS(G190A/G194A) auf die *dcuB-lacZ* Expression

In der periplasmatischen und cytoplasmatischen PAS-Domäne von DcuS konnten Aminosäuresubstitutionen identifiziert werden, die in Gegenwart des Effektors Fumarat nur noch eine Hintergrundexpression von *dcuB-lacZ* aufweisen (Kneuper et al. 2005; Monzel et al. 2013). Diese DcuS-OFF-Mutanten bzw. Varianten verhalten sich wie der DcuS-defiziente Stamm IMW260. Das DcuSR-System befindet sich durchgehend im inaktiven Zustand. Dabei wird in den PAS_p-Varianten die Detektion des Effektors gestört und bei den PAS_c-Mutanten die Struktur so beeinträchtigt, dass die Kinasedomäne permanent ruhiggestellt wird. Darüber hinaus konnten auch ON-Varianten in PAS_c gefunden werden (Etzkorn et al. 2008). Bei diesen ist das DcuSR-System unabhängig von Effektoren kontinuierlich im ON-Zustand. Die cytoplasmatische PAS-Domäne ist nicht mehr in der Lage die Autophosphorylierung der Kinase in Abwesenheit des Effektors Fumarat zu inhibieren.

In weiterführenden Versuchen sollte der Funktionszustand von kombinierten DcuS-Varianten aus DcuS(G190A/G194A) und OFF- bzw. ON-Mutationen untersucht werden. Dafür

wurden anhand von zielgerichteter Mutagenese die Substitutionen der OFF- bzw. ON-Mutanten in pMW813 (pDcuS(G190A/G194A)) eingeführt und dessen Derivate in IMW260 transformiert. Der Funktionszustand dieser Varianten wurde wie bereits zuvor unter 4.2.1.3 beschrieben mit Hilfe der *dcuB-lacZ* Expression durch β -Galactosidaseaktivitätsmessungen bestimmt.

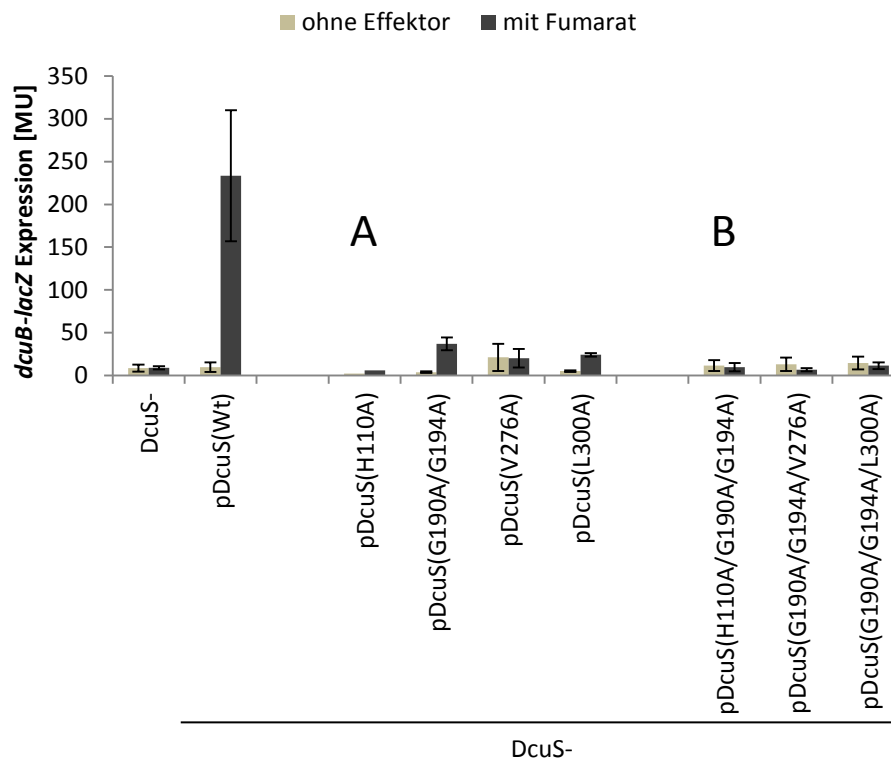


Abb. E22: Einfluss von DcuS-OFF-Varianten in Kombination mit pDcuS(G190A/G194A) auf die Expression von *dcuB-lacZ*. Der DcuS-defiziente Stamm IMW260 (DcuS-) wurde mit Derivaten des Plasmids pMW181 (pDcuS(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die Expression von *dcuB-lacZ* der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige Balken). 20 mM Fumarat wurde als Effektor benutzt (dunkelgraue Balken). Expression von *dcuB-lacZ* der einzelnen OFF-Varianten und DcuS(G190A/G194A) (A) sowie deren Kombination (B). DcuS-: IMW260; pDcuS(Wt): pMW181; pDcuS(H110A): pMW236; pDcuS(G190A/G194A): pMW813; pDcuS(V276A): pMW667; pDcuS(L300A): pMW922; pDcuS(H110A/G190A/G194A): pMW1802; pDcuS(G190A/G194A/V276A): pMW1804; pDcuS(G190A/G194A/L300A): pMW1805

In Abbildung E22 sind die Funktionszustände der einzelnen OFF-Varianten DcuS(H110A), DcuS(V276A) sowie DcuS(L300A) (Abb. E22A) den Funktionszuständen der kombinierten OFF-Varianten (Abb. E22B) gegenüber gestellt. Dabei fällt auf, dass die geringe Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ* der TM2-Variante DcuS(G190A/G194A) mit Fumarat in den kombinierten Mutanten nicht mehr vorhanden ist. Die kombinierten Varianten besitzen ebenso wie die Varianten DcuS(H110A), DcuS(V276A) und DcuS(L300A) alle den OFF-

Phänotyp. Das DcuSR-System liegt also unabhängig vom Effektor Fumarat permanent im inaktiven Zustand vor.

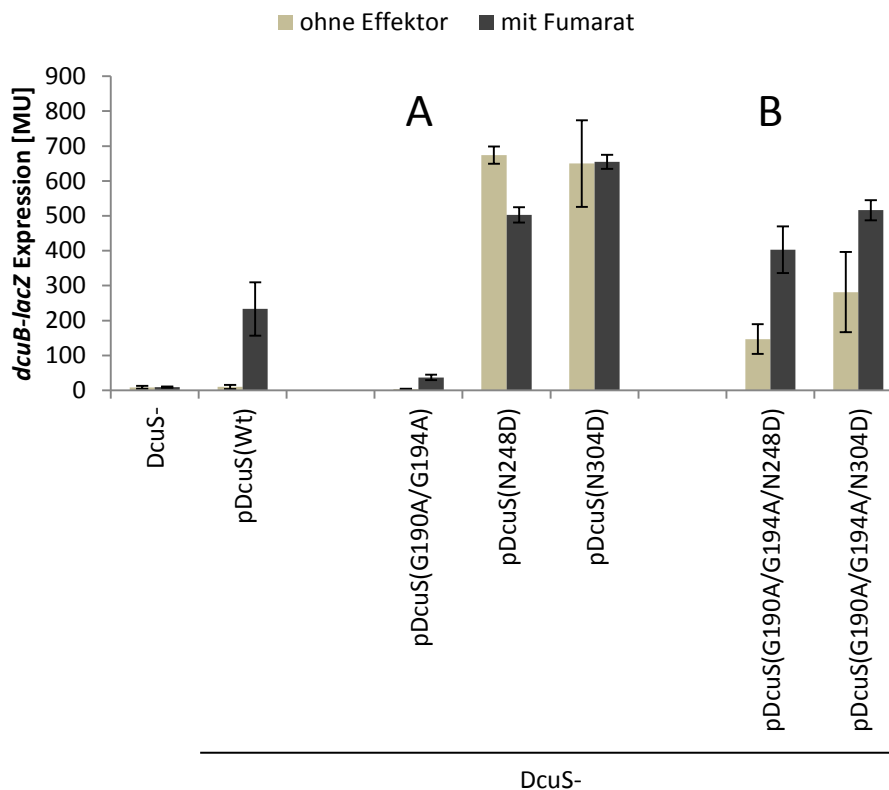


Abb. E23: Einfluss von DcuS-ON-Varianten in Kombination mit pDcuS(G190A/G194A) auf die Expression von *dcuB-lacZ*. Der DcuS-defiziente Stamm IMW260 (DcuS-) wurde mit Derivaten des Plasmids pMW181 (pDcuS(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die Expression von *dcuB-lacZ* der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige Balken). 20 mM Fumarat wurde als Effektor benutzt (dunkelgraue Balken). Expression von *dcuB-lacZ* der einzelnen ON-Varianten und DcuS(G190A/G194A) (A) sowie deren Kombination (B). DcuS-: IMW260; pDcuS(Wt): pMW181; pDcuS(G190A/G194A): pMW813; pDcuS(N248D): pMW421; pDcuS(N304D): pMW488; pDcuS(G190A/G194A/N248D): pMW1803; pDcuS(G190A/G194A/N304D): pMW1806

Abbildung E23 zeigt die Auswirkung der ON-Substitutionen N248D und N304D auf die Funktion der TM-Variante DcuS(G190A/G194A). Die ON-Varianten DcuS(N248D) und DcuS(N304D) weisen bereits in Abwesenheit des Effektors Fumarat ihre maximale *dcuB-lacZ* Expression auf (Abb. E23A). Diese kann durch Fumarat nicht weiter gesteigert werden und fällt im Fall von DcuS(N248D) noch geringfügig ab. Der Vergleich mit der wildtypischen Positivkontrolle IMW260 mit pMW181 (DcuS- pDcuS(Wt)) offenbart, dass die maximale Expressionsstärke dieser ON-Mutanten um den Faktor 3 erhöht ist. Bei den kombinierten Varianten DcuS(G190A/G194A/N248D) und DcuS(G190A/G194A/N304D) hingegen bewirkt Fumarat wieder eine Expressionssteigerung des Reportergens *dcuB-lacZ* (Abb. E23B). Die

Induktion der Expression von *dcuB-lacZ* erfolgt bei diesen Varianten jedoch nur um den Faktor 2 bzw. 3, da die Reporterexpressionen ohne Effektor bereits sehr hoch sind. Darüber hinaus ist die maximale Expression von *dcuB-lacZ* der kombinierten Varianten im Vergleich zu den ON-Varianten leicht reduziert. Die Varianten DcuS(G190A/G194A/N248D) und DcuS(G190A/G194A/N304D) besitzen nun wieder die Fähigkeit auf Fumarat zu reagieren.

4.2.1.5 Einfluss einer DcuB-Defizienz auf die *dcuB-lacZ* Expression der TM2-Varianten DcuS(S186C/G190A) und (G190A/G194A)

Der C₄-Dicarboxylat-Antiporter DcuB, dessen Expression durch DcuSR reguliert wird, ist ein bifunktionales Protein (Zientz et al. 1998; Kleefeld et al. 2009). Unter anaeroben Bedingungen katalysiert dieser einerseits die Aufnahme von Fumarat im Antiport mit Succinat (Six et al. 1994). Andererseits wirkt sich DcuB regulatorisch auf das DcuSR-Zweikomponentensystem aus und kontrolliert demnach seine eigene Expression (Kleefeld et al. 2009). Eine Deletion von *dcuB* schaltet das DcuSR-System unentwegt in den ON-Zustand. C₄-Dicarbonsäuren werden folglich nicht mehr zur Induktion der DcuSR-regulierten Gene benötigt.

Der regulatorische Effekt dieser DcuB-Defizienz auf die TM2-Varianten DcuS(S186C/G190A) und DcuS(G190A/G194A) sollte im Stamm IMW536 anhand einer chromosomalen *dcuB-lacZ* Reporterfusion gemessen werden. In diesem *E. coli* Stamm sind sowohl *dcuS* als auch *dcuB* durch Insertionen von Resistenzkassetten ausgeschaltet.

Beim DcuB- und DcuS-defizienten Stamm IMW536 (DcuB⁻ DcuS⁻) ist sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Fumarat lediglich eine Hintergrundexpression von *dcuB-lacZ* messbar (Abb. E24). Aufgrund des DcuS-Defektes können die Effektoren nicht mehr detektiert werden und die Zielgene des DcuSR-Systems werden nicht mehr angeschaltet. Die Komplementation von IMW536 mit pMW181 (DcuB⁻ DcuS⁻ pDcuS(Wt)) hingegen weist schon ohne Effektoren eine deutliche Reporterexpression auf. Im DcuB-freien Hintergrund befindet sich das DcuSR-System permanent im aktiven Zustand. Durch den Effektor Fumarat wird die Expression von *dcuB-lacZ* noch um den Faktor 2 gesteigert. Die TM2-Varianten DcuS(S186C/G190A) und DcuS(G190A/G194A) zeigen im Vergleich zur

wildtypischen Positivkontrolle (DcuB- DcuS- pDcuS(Wt)) auch im DcuB-negativen Stamm IMW536 einen reduzierten Funktionszustand. Die Reporterexpressionen der TM2-Mutanten liegen nur minimal über der Hintergrundaktivität von IMW536 (DcuB- DcuS-). Zudem ist eine Stimulation von *dcuB-lacZ* dieser Varianten durch Fumarat nicht mehr nachweisbar. In Stamm IMW536 sind die Varianten DcuS(S186C/G190A) und DcuS(G190A/G194A) damit nicht mehr in der Lage auf Effektoren zu reagieren und die Induktion der DcuSR-regulierten Gene zu induzieren.

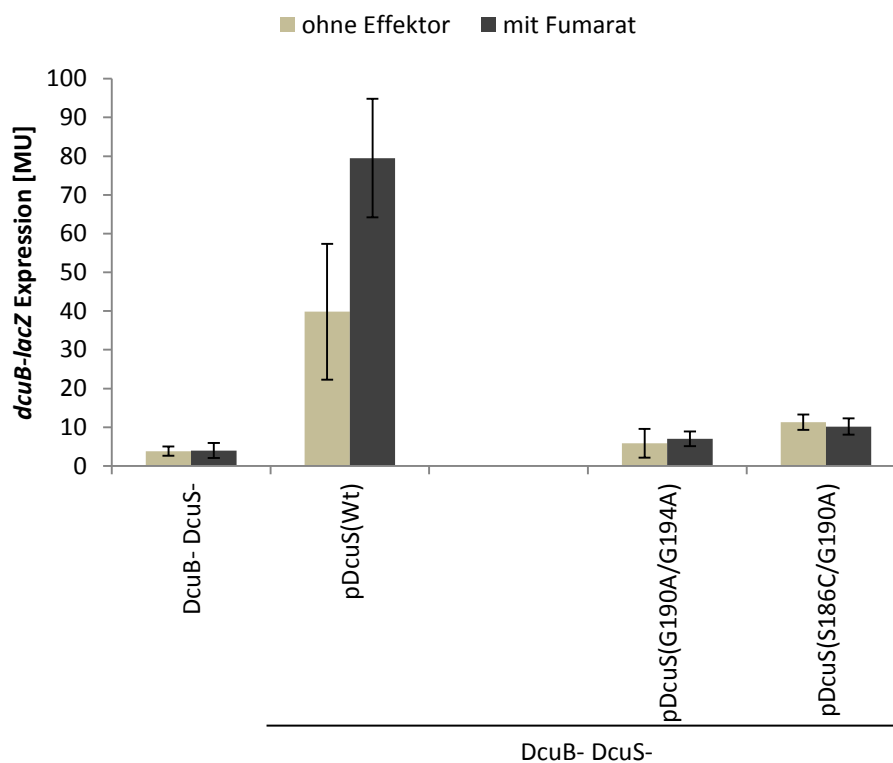


Abb. E24: Einfluss einer DcuB-Defizienz auf die Expression von *dcuB-lacZ* der Varianten pDcuS(S186C/G190A) und pDcuS(G190A/G194A). Der DcuB- und DcuS-defiziente Stamm IMW536 (DcuB- DcuS-) wurde mit Derivaten des Plasmids pMW181 (pDcuS(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die Reporterexpression der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige Balken). 20 mM Fumarat wurde als Effektor benutzt (dunkelgraue Balken). DcuB- DcuS-: IMW536; pDcuS(Wt): pMW181; pDcuS(S186C/G190A): pMW809; pDcuS(G190A/G194A): pMW813

4.2.1.6 Expressionsnachweis und Membranintegration der Varianten DcuS(S186C/G190A) und DcuS(G190A/G194A)

Die Substitutionen S186C/G190A sowie G190A/G194A im SxxxGxxxG-Motiv der zweiten Transmembranhelix von DcuS haben deutliche Auswirkungen auf die Funktion der Sensorkinase. Mit folgenden Versuchen sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Beeinträchtigungen von DcuS(S186C/G190A) und DcuS(G190A/G194A) auf

eine gestörte Expression oder eine gestörte Membranintegration dieser DcuS-Varianten zurückzuführen sind.

Die Expression der DcuS-Varianten wurde im Anschluss an eine Proteinauftrennung durch SDS-PAGE und dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mit PAS_p-Antiserum nachgewiesen.

Beide TM2-Varianten DcuS(G190A/G194A) (Abb. E25: 3) und DcuS(S186C/G190A) (Abb. E25: 4) konnten bei 57 kDa, der apparenten Laufhöhe von DcuS, nachgewiesen werden. Die Abweichung zum berechneten Molekulargewicht von 63 kDa ist bei hydrophoben Membranproteinen häufig zu beobachten und korrespondiert mit vorausgegangenen Untersuchungen (Scheu 2009). Der DcuS-defiziente Stamm IMW260 besitzt keine Bande auf dieser Höhe (Abb. E25: 1). Die Expressionsstärke der TM2-Varianten entspricht der wildtypischen Kontrolle (pDcuS(Wt)) (E25: 2), die Austausche haben also keine Auswirkung auf die Expression der Varianten.

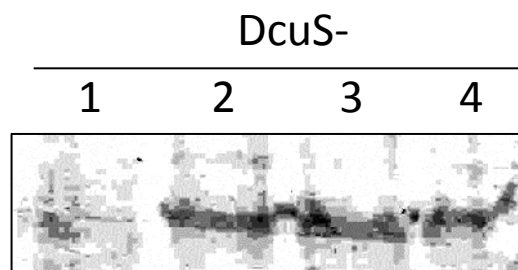


Abb. E25 Expressionsnachweis der Varianten pDcuS(S186C/G190A) und pDcuS(G190A/G194A). Der DcuS-defiziente Stamm IMW260 (DcuS-) wurde mit Derivaten des Plasmids pMW181 (pDcuS(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO sowie 20 mM Fumarat als Elektronenakzeptoren. Pro Spur wurden 200 µg Gesamtprotein aufgetragen. DcuS wurde mit DcuS-PAS_p-Antiserum und Chloronaphthol-Entwicklung nachgewiesen. (1) DcuS-: IMW260; (2) pDcuS(Wt): pMW181; (3) pDcuS(G190A/G194A): pMW813; (4) pDcuS(S186C/G190A): pMW809

Der Einfluss der TM2-Substitutionen S186C/G190A und G190A/G194A auf die Membranintegration und Lokalisation von DcuS wurde *in vivo* mit DcuS-YFP Fusionen anhand von Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert. YFP stellt eine Variante des grün fluoreszierenden Proteins aus *Aequorea victoria* dar, welches die Aminosäuresubstitutionen S65G, V68L, S72A und T203Y besitzt (Ormö et al. 1996). Dieses GFP-Derivat hat sein Anregungsmaximum bei 513 nm und emittiert maximal bei 527 nm. Die Aminosäureaustausche S186C/G190A und G190A/G194A wurden anhand von zielgerichteter

Mutagenese in den Expressionsvektor pMW407 (Scheu et al. 2008) eingebracht. Das Plasmid pMW407 beinhaltet eine C-terminale Fusion von YFP mit DcuS, die unter der Kontrolle eines L-Arabinose induzierbaren Promotors steht. Für diese DcuS-YFP Fusion ist die Integration sowie die polare Anreicherung von DcuS-YFP in der Membran von *E. coli* gezeigt worden (Scheu et al. 2008). Des Weiteren war DcuS-YFP sowohl in Wachstumsversuchen als auch Reporter gemessungen in der Lage die DcuS-Defekte von *E. coli* Stämmen zu komplementieren.

Wildtypisches DcuS-YFP(Wt) (Abb. E26A) kommt wie bereits durch Scheu et al. (2008) beschrieben in der Membran der Zellen hauptsächlich in polaren Clustern vor. Neben den Fluoreszenzmaxima an den Zellpolen, ist noch schwächeres Leuchten an den Rändern der Zelle zu beobachten. Vergleichbare Verteilungsmuster zeigen auch die Varianten DcuS-YFP(S186C/G190A) (Abb. E26B) und DcuS-YFP(G190A/G194A) (Abb. E26C). In gleicher Weise treten bei diesen Varianten die maximalen Fluoreszenzintensitäten an den Zellpolen sowie schwächeres laterales Leuchten auf. Zudem können keine Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten der YFP-Fusionen identifiziert werden. Folglich haben die Substitutionen S186C/G190A und G190A/G194A keine Auswirkung auf die Membranintegration, Expression und Lokalisierung von DcuS-YFP.

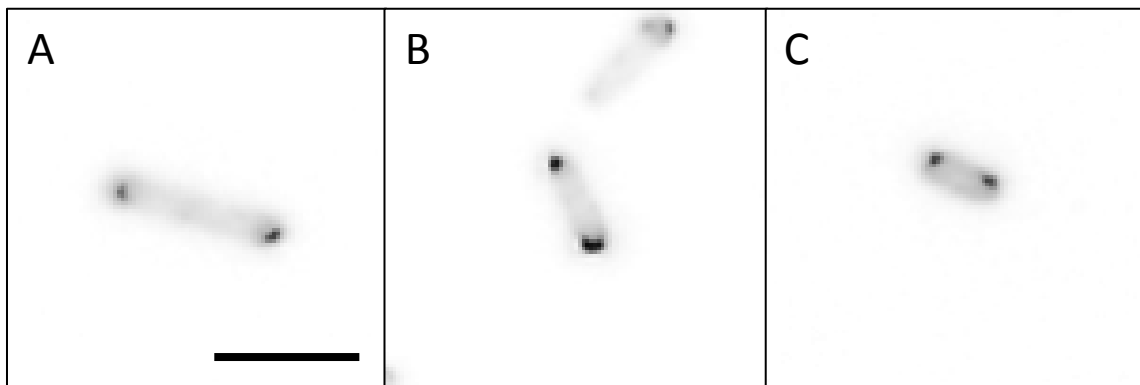


Abb. E26: Membranintegration, Expressionsnachweis und Lokalisierung der Varianten pDcuS-YFP(S186C/G190A) und pDcuS-YFP(G190A/G194A). Der Stamm JM109 wurde mit Derivaten des Plasmids pMW407 (pDcuS-YFP(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte aerob in LB-Medium bei 30 °C bis zu einer OD_{578nm} von 0,5-0,7. Die DcuS-YFP Varianten wurden durch 133 μ M L-Arabinose von Beginn an induziert. (A) pDcuS-YFP(Wt): pMW407; (B) pDcuS-YFP(S186C/G190A): pMW1201; (C) pDcuS-YFP(G190A/G194A): pMW1200

4.2.2 Interaktionsstudien zu TM1 und TM2 aus DcuS

DcuS bildet Dimere bzw. Tetramere in der Membran von *E. coli* (Scheu et al. 2010a). Der oligomere Zustand der Histidinkinase DcuS wurde *in vivo* sowie *in vitro* nachgewiesen (Scheu

et al. 2010a) und ist generell bedeutend für die Transphosphorylierung von Histidinkinasen (Stock et al. 2000; Gao & Stock 2009). Darüber hinaus reduzieren sequentielle C-terminale Verkürzungen der Kinase- und PAS_C-Domänen die Homodimerisierung von DcuS im BACTH-Test (Monzel et al. 2013). So ist die Homodimerisierung der Variante DcuS-TM2, bei der die PAS_C- und Kinasedomäne fehlen, zwar stark beeinträchtigt, sie ist jedoch immer noch nachweisbar. Demnach müssen entweder PAS_P oder die Transmembranhelices bzw. beide zusammen zur Wechselwirkung der Monomere beitragen. In den folgenden Untersuchungen sollte bestimmt werden, welchen Beitrag die Transmembrandomänen 1 und 2 bei der Oligomerisierung von DcuS leisten. Dabei galt besonderes Augenmerk den Substitutionen S186C/G190A und G190A/G194A aus dem SmallxxxSmall-Tandemmotiv von TM2, welche die Funktion von DcuS stark beeinträchtigen. Solche Sequenzmotive bilden Interaktionsschnittstellen, die Helix-Helix Assoziation ermöglichen (Russ & Engelman 2000).

4.2.2.1 BACTH: Homodimerisierung von DcuS TM1- und TM2-Varianten

Den Einfluss von Aminosäureaustauschen in den Transmembranhelices 1 und 2, vor allem der Substitutionen der SmallxxxSmall-Motive, auf die Homodimerisierung von DcuS wurden im BACTH-System überprüft. Die Versuche wurden analog zu den Heterodimerisierungsversuchen der DctA-Varianten mit DcuS (4.1.1.7) durchgeführt. Die Rekonstitution der Adenylatcyclase von Reporterstamm BTH101 erfolgte hier durch die Kombination der Fusionen T18-DcuS und T25-DcuS, die beispielhaft in Abbildung E27 dargestellt ist. Als Maß für die Stärke der Wechselwirkung der DcuS TM-Varianten wurde die β -Galactosidaseaktivität bestimmt.

Die Aminosäuresubstitutionen der Transmembrandomänen wurden mittels zielgerichteter Mutagenese in die Plasmide pMW429 (T18-DcuS(Wt)) und pMW426 (T25-DcuS(Wt)) eingeführt. Der *cyo*-Defekt von BTH101 wurde durch die Transformation der Derivate von pMW429 (T18-DcuS) und pMW426 (T25-DcuS) komplementiert.

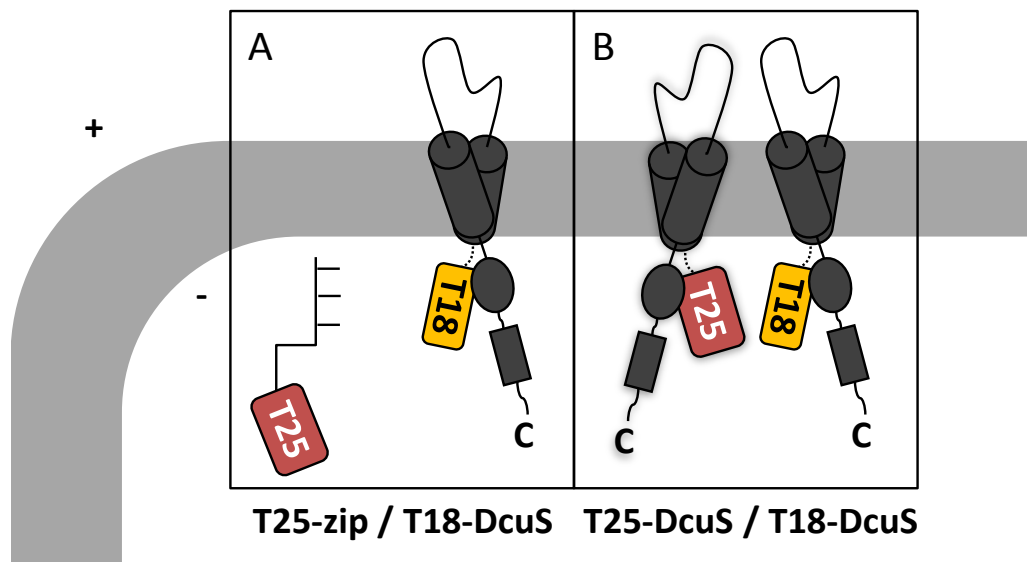


Abb. E27: Schematische Darstellung der BACTH-Interaktionsmessungen der Konstrukte T18-DcuS und T25-DcuS. (A) Kontrolle zur Hintergrundaktivität: T18-DcuS (pMW429) und T25-zip (pKT25-zip). (B) Konstrukte zur Bestimmung der Homodimerisierung von DcuS: T18-DcuS (pMW429) und T25-DcuS (pMW426).

Die Homodimerisierung von T18-DcuS(Wt) mit T25-DcuS(Wt) wurde als Positivkontrolle für Interaktion im BACTH-System genutzt (Abb. E28). Zum Vergleich mit den TM-Varianten wurde die β -Galactosidaseaktivität dieser Kombination auf 100 % gesetzt und alle weiteren Werte mit diesem Wert standardisiert. Der Ansatz T18-DcuS(Wt) mit T25-zip(Wt) hingegen bestimmt den Schwellenwert für die Interaktion und ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die Substitutionen S26A und A27G/S31C der 1. Transmembrandomäne (Abb. E28A) sowie die Aminosäureaustausche S186C, S186C/G190A, S186P und G190A des SxxxGxxxG-Tandemmotivs von TM2 (Abb. E28B) beeinträchtigen die DcuS Homodimerisierung nur bedingt. Bei diesen Mutationen sind die β -Galactosidaseaktivitäten im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle lediglich um 12 - 32 % reduziert. Maßgebenden Einfluss auf die Interaktion des Homodimers besitzen im Gegensatz dazu die Substitutionen G194A und G190A/G194A. So erreicht die Variante G194A lediglich 55 % der wildtypischen β -Galactosidaseaktivität. Im Fall der Mutation G190A/G194A werden nur noch 32 % der Aktivität der Positivkontrolle erzielt. Dieser Austausch stört die Homodimerisierung von DcuS erheblich.

Für die beiden Doppelsubstitutionen S186C/G190A und G190A/G194A konnten vergleichbare Ergebnisse in BACTH-Messungen mit verkürzten DcuS-Konstrukten DcuS-TM2-T18 und DcuS-TM2-T25 ermittelt werden (Abb. A16). Variante S186C/G190A verhält sich bei diesem Ansatz erneut wie die wildtypische Positivkontrolle. Die Mutation G190A/G194A

hingegen besitzt in dem verkürzten DcuS-Konstrukt abermals gravierende Auswirkungen auf die Homodimerisierung, ihre β -Galactosidaseaktivität liegt kaum über der Hintergrundaktivität der Negativkontrolle.

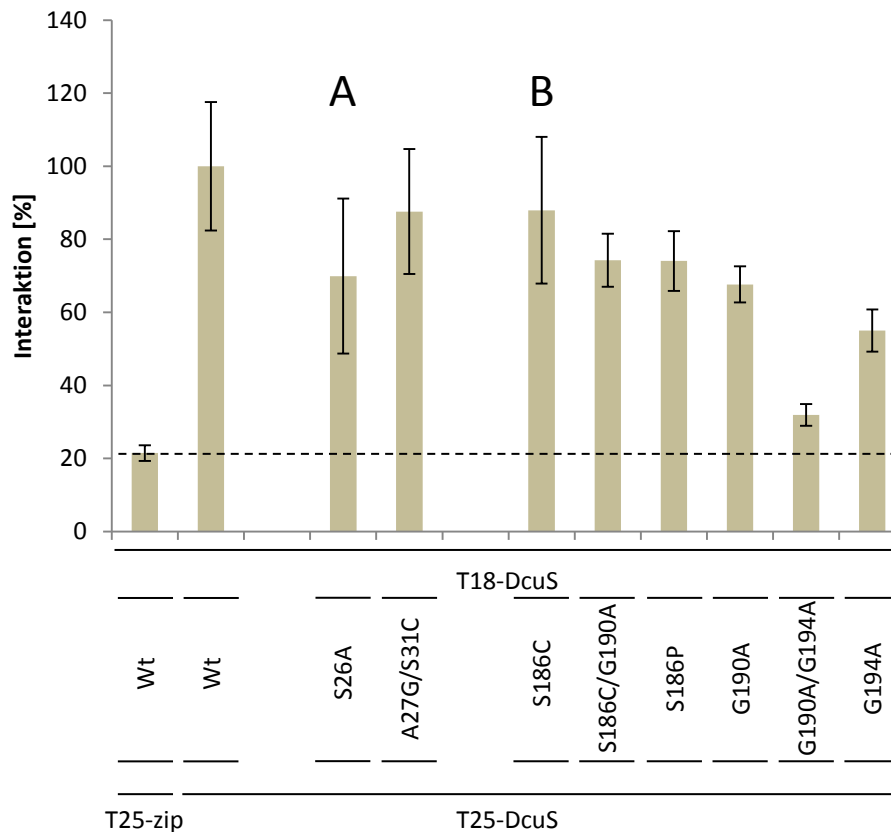


Abb. E28: Homodimerisierung von TM1- (A) sowie TM2-Varianten (B) der Fusionen T18-DcuS und T25-DcuS. Der Stamm BTH101 wurde mit Derivaten der Plasmide pMW429 (T18-DcuS(Wt)) und pMW426 (T25-DcuS(Wt)) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C. Die Varianten der Fusionsprodukte T18-DcuS und T25-DcuS wurden durch 0,5 mM IPTG exprimiert. Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Interaktion zwischen T18-DcuS(Wt) und T25-DcuS(Wt) wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für Interaktion dar. Dieser wurde durch die Kombination T18-DcuS(Wt) und T25-*zip*(Wt) festgelegt. T18-Fusionen: T18-DcuS(Wt): pMW429; T18-DcuS(S26A): pMW1834; T18-DcuS(A27G/S31C): pMW1836; T18-DcuS(S186C): pMW1752; T18-DcuS(S186C/G190A): pMW1210; T18-DcuS(S186P): pMW1712; T18-DcuS(G190A): pMW1754; T18-DcuS(G190A/G194A): pMW1212; T18-DcuS(G194A): pMW1755. T25-Fusionen: T25-*zip*(Wt): pKT25-*zip*; T25-DcuS(Wt): pMW426; T25-DcuS(S26A): pMW1831; T25-DcuS(A27G/S31C): pMW1833; T25-DcuS(S186C): pMW1748; T25-DcuS(S186C/G190A): pMW1209; T25-DcuS(S186P): pMW1711; T25-DcuS(G190A): pMW1750; T25-DcuS(G190A/G194A): pMW1211; T25-DcuS(G194A): pMW1751.

4.2.2.2 BACTH: Der Effekt von Fumarat auf die Homodimerisierung von TM1- und TM2-Varianten

DcuS bildet sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Fumarat ein funktionales Homodimer (Scheu et al. 2010a). Die Bindung von Effektoren in der periplasmatischen PAS_P Domäne hat jedoch erhebliche strukturelle Veränderungen der Sensor kinase DcuS zur Folge.

In Bezug auf den Signaltransfer über die Membran wird zum Beispiel von einer vektoriellen Verschiebung der TM2 in Richtung des Periplasmas ausgegangen (Scheu et al. 2010b; Monzel unveröffentlicht). Inwieweit die Interaktion der TMs dabei eine Rolle spielen ist unklar. Der Einfluss des Effektors Fumarat auf die Homoassoziation einiger TM1- und TM2-Varianten der Fusionen T18-DcuS und T25-DcuS wurde untersucht. So sollte eine mögliche Beeinträchtigung der Signaltransduktion durch die Aminosäureaustausche bestimmt werden.

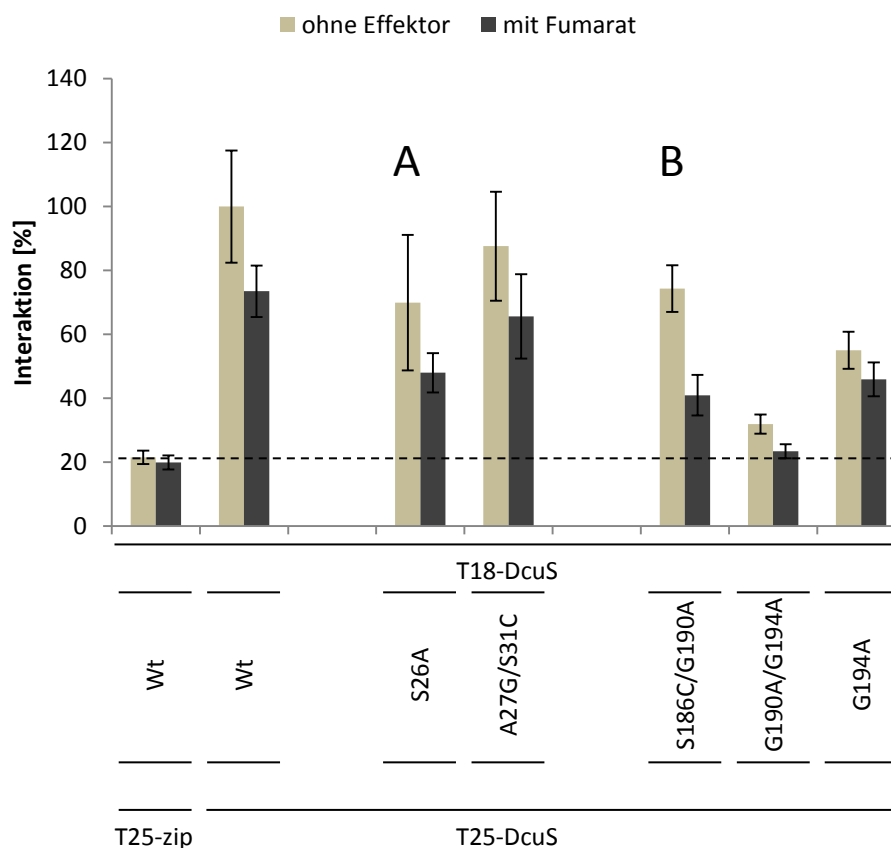


Abb. E29: Einfluss von Fumarat auf die Homodimerisierung von TM1 (A) sowie TM2 (B) Varianten der Fusionen T18-DcuS und T25-DcuS. Der Stamm BTH101 wurde mit Derivaten der Plasmide pMW429 (T18-DcuS(Wt)) und pMW426 (T25-DcuS(Wt)) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium bei 30°C mit (dunkelgraue Balken) und ohne 50 mM Fumarat (beige Balken). Die Varianten der Fusionsprodukte T18-DcuS und T25-DcuS wurden durch 0,5 mM IPTG exprimiert. Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Interaktion zwischen T18-DcuS(Wt) und T25-DcuS(Wt) ohne Fumarat wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für Interaktion dar. Dieser wurde durch die Kombination T18-DcuS(Wt) und T25-zip festgelegt. T18-Fusionen: T18-DcuS(Wt): pMW429; T18-DcuS(S26A): pMW1834; T18-DcuS(A27G/S31C): pMW1836; T18-DcuS(S186C): pMW1752; T18-DcuS(S186C/G190A): pMW1210; T18-DcuS(S186P): pMW1712; T18-DcuS(G190A): pMW1754; T18-DcuS(G190A/G194A): pMW1212; T18-DcuS(G194A): pMW1755. T25-Fusionen: T25-zip(Wt): pKT25-zip; T25-DcuS(Wt): pMW426; T25-DcuS(S26A): pMW1831; T25-DcuS(A27G/S31C): pMW1833; T25-DcuS(S186C): pMW1748; T25-DcuS(S186C/G190A): pMW1209; T25-DcuS(S186P): pMW1711; T25-DcuS(G190A): pMW1750; T25-DcuS(G190A/G194A): pMW1211; T25-DcuS(G194A): pMW1751.

Die Ergebnisse der Interaktionsstudien mit Fumarat sind den Messungen ohne den Effektor in Abbildung E29 gegenüber gestellt. Erneut wurden die β -Galactosidaseaktivitäten aller Ansätze anhand der Positivkontrolle T18-DcuS(Wt) mit T25-DcuS(Wt) (ohne Fumarat) standardisiert. Die Kombination T18-DcuS(Wt) mit T25-zip(Wt) in An- bzw. Abwesenheit von Fumarat bestimmt den Schwellenwert für die Interaktion und ist durch die gestrichelte Linie visualisiert. Der Vergleich der Messungen mit bzw. ohne den Effektor Fumarat zeigt, dass sich Fumarat für die Mehrheit der Varianten nur minimal auf die Interaktion des T18-DcuS/T25-DcuS Homodimers auswirkt. Generell sind die β -Galactosidaseaktivitäten der Ansätze mit Fumarat leicht reduziert. Lediglich bei Mutation S186C/G190A kann eine eindeutige Auswirkung von Fumarat auf die Homodimerisierung beobachtet werden. In Gegenwart von Fumarat wird die β -Galactosidaseaktivität der Variante S186C/G190A von 74% auf 41 % der Aktivität der Positivkontrolle herabgesetzt. Bei dieser Mutation ist möglicherweise ein Fumarat-induzierter Interaktionsverlust zu erkennen.

4.2.2.3 BACTH: Heterodimerisierung von DcuS TM1- und TM2-Doppelmutanten

GxxxG-ähnliche Sequenzmotive bilden aufgrund ihrer Positionierung flache Oberflächen auf einer Helixseite. Diese Oberflächen bieten Helices die Möglichkeit sich eng aneinander zu packen und zu interagieren. Für das GxxxG-Motiv aus humanen Glycophorin A (GpA) konnte gezeigt werden, dass die Motive beider GpA Monomere für die wildtypische Interaktion benötigt werden (Schneider & Engelman 2003). In den folgenden Untersuchungen wurde die Auswirkung von Substitutionen im SxxxGxxxG-Motiv eines der beiden DcuS Monomere auf die Interaktion des Dimers analysiert. Die Heterodimerisierung der Doppelmutationen A27G/S31C, S186C/G190A und G190A/G194A wurde im BACTH mit Varianten der Fusionen T18-DcuS und T25-DcuS durchgeführt.

Erneut dienen die Kombinationen T18-DcuS(Wt) mit T25-DcuS(Wt) und T18-DcuS(Wt) mit T25-zip(Wt) als Positiv- bzw. Negativkontrolle für Interaktionen im BACTH-System (Abb. E30). Die Hintergrundaktivität der Negativkontrolle ist durch die gestrichelte Linie dargestellt. Die β -Galactosidaseaktivität der Positivkontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Heterodimerisierungsansätze wurden dementsprechend standardisiert. Der Vergleich der β -Galactosidaseaktivitäten der beiden möglichen Kombinationen für jede Heterodimerisierung zeigt, dass es bei fast allen Ansätzen keine Rolle spielt, ob die Austausch in T18-DcuS oder

T25-DcuS vorliegen. Die einzigen Ausnahmen stellen die Kombinationen T18-DcuS(Wt) mit T25-DcuS(G190A/G194A) und T18-DcuS(G190A/G194A) mit T25-DcuS(Wt) dar. Bei letzterem Ansatz ist die Wechselwirkung des DcuS Heterodimers stärker beeinträchtigt. Generell hat die Doppelmutation G190A/G194A, wie bereits bei der Homodimerisierung betrachtet, den größten Einfluss auf die Heterodimerisierung von DcuS. Diese Heterodimerisierungen liegen aber noch deutlich über der Wechselwirkung des T18-DcuS(G190A/G194A)/T25-DcuS(G190A/G194A) Homodimers.

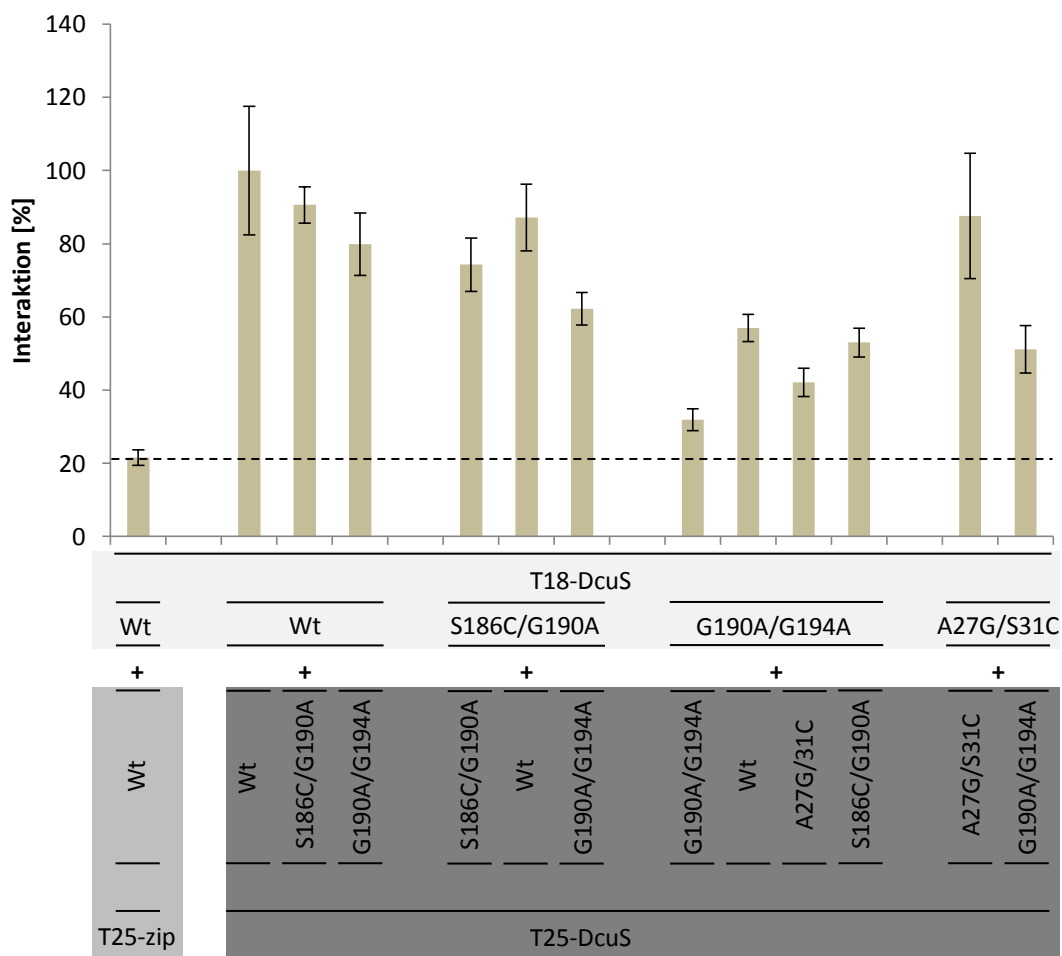


Abb. E30: Heterodimerisierung von TM1- und TM2-Doppelmutanten der Fusionen T18-DcuS und T25-DcuS. Der Stamm BTH101 wurde mit Derivaten der Plasmide pMW429 (T18-DcuS(Wt)) und pMW426 (T25-DcuS(Wt)) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C. Die Varianten der Fusionsprodukte T18-DcuS und T25-DcuS wurden durch 0,5 mM IPTG exprimiert. Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Interaktion zwischen T18-DcuS(Wt) und T25-DcuS(Wt) wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für Interaktion dar. Dieser wurde durch die Kombination T18-DcuS(Wt) und T25-zip(Wt) festgelegt. T18-Fusionen: T18-DcuS(Wt): pMW429; T18-DcuS(A27G/S31C): pMW1836; T18-DcuS(S186C/G190A): pMW1210; T18-DcuS(G190A/G194A): pMW1212. T25-Fusionen: T25-zip(Wt): pKT25-zip; T25-DcuS(Wt): pMW426; T25-DcuS(A27G/S31C): pMW1833; T25-DcuS(S186C/G190A): pMW1209; T25-DcuS(G190A/G194A): pMW1211.

4.2.2.4 BACTH: Expressionskontrolle und Membranintegration

Die Substitutionen S186C/G190A, G190A/G194A und G194A besitzen unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Dimerisierung von T18-DcuS und T25-DcuS im BACTH-System. Mit Expressionskontrollen der T18- und T25-DcuS Varianten dieser Austausche, sollte sichergestellt werden, dass die beobachteten Interaktionsverluste nicht durch fehlende oder veränderte Gehalte der Fusionen zustande kommen. Aufgrund der erheblichen Beeinträchtigung der Homo- sowie Heterodimerisierung der Konstrukte T18-DcuS(G190A/G194A) und T25-DcuS(G190A/G194A) wurde zusätzlich deren Membranintegration kontrolliert.

Der Gehalt von T18- und T25-DcuS der untersuchten Varianten wurde nach SDS-Gelelektrophorese von 100 µg Gesamtprotein und der Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mit PAS_p-Antiserum nachgewiesen.

In Abbildung E31 sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse der T18- und T25-Fusionen zusammengefasst. Dabei dienen die wildtypischen Konstrukte T18-DcuS(Wt) und T25-DcuS(Wt) (Abb. E31: 2; 9) dem Vergleich mit den Mutanten. Die berechneten Molekulargewichte dieser beiden betragen 80,6 kDa bzw. 85,6 kDa. Sowohl die Varianten von T18-DcuS (Abb. E31: 3-5) als auch die Varianten von T25-DcuS (Abb. E31: 6-8) können mit vergleichbarer Expressionsstärke und auf der Laufhöhe der entsprechenden Kontrolle nachgewiesen werden. Bei Stamm BTH101 taucht hingegen keine Bande auf. Demzufolge besitzen die Substitutionen S186C/G190A, G190A/G194A und G194A keinen Einfluss auf die Expression der Fusionen T18- und T25-DcuS.

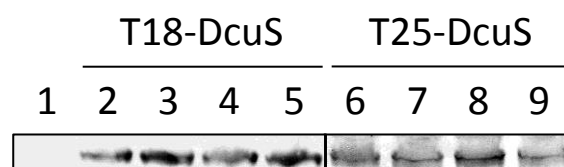


Abb. E31: Expressionsnachweis von Varianten der Fusionen T18-DcuS und T25-DcuS. Der Stamm BTH101 wurde mit Derivaten der Plasmide pMW426 (T18-DcuS(Wt)) oder pMW426 (T25-DcuS(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte aerob in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,5-0,7. Die Varianten der Fusionsprodukte T18-DcuS und T25-DcuS wurden mit 0,5 mM IPTG induziert. Pro Spur wurden 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Fusionen von DcuS wurden mit DcuS-PAS_p-Antiserum nachgewiesen. (1) BTH101; (2) T18-DcuS(Wt): pMW429; (3) T18-DcuS(G190A/G194A): pMW1212; (4) T18-DcuS(S186C/G190A): pMW1210; (5) T18-DcuS(G194A): pMW1755; (6) T25-DcuS(G194A): pMW1751; (7) T25-DcuS(S186C/G190A): pMW1209; (8) ; T25-DcuS(G190A/G194A): pMW1211; (9) T25-DcuS(Wt): pMW426

Ferner wurde die Membranintegration der Varianten T18-DcuS(G190A/G194A) und T25-DcuS(G190A/G194A) im Vergleich zu den wildtypischen Fusionen T18-DcuS(Wt) und T25-DcuS(Wt) analysiert. Dazu wurden Derivate der Expressionsvektoren pMW429 (T18-DcuS(Wt)) oder pMW426 (T25-DcuS(Wt)) in Stamm JM109 transformiert und die Synthese der Fusionsproteine mit 0,5 mM IPTG induziert. Die T18- bzw. T25-DcuS Varianten wurden aus diesen Membranisolaten wie bei den Expressionsnachweisen auf Immunoblots mit PAS_p-Antiserum nachgewiesen.

Beide Varianten T18-DcuS(G190A/G194A) (Abb. E32: 2) und T25-DcuS(G190A/G194A) (Abb. E32: 3) konnten in den jeweiligen Membranisolaten mit vergleichbarem Laufverhalten der entsprechenden wildtypischen Kontrolle (Abb. E32: 1; 4) nachgewiesen werden. Dazu stimmen bei den T18-DcuS-Konstrukten ebenfalls die Expressionsstärken überein. Die Proteinmengen der T25-DcuS-Varianten hingegen variieren. T25-DcuS(G190A/G194A) weist eine schwächere Bande als die wildtypische Kontrolle T25-DcuS(Wt) auf, ist jedoch noch in ausreichender Menge vorhanden.

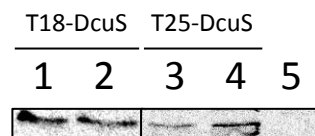


Abb. E32: Membranintegration der Varianten T18-DcuS(G190A/G194A) und T25-DcuS(G190A/G194A). Der Stamm JM109 wurde mit Derivaten der Plasmide pMW426 (T18-DcuS(Wt)) oder pMW426 (T25-DcuS(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte aerob in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,6. Aus 2 ml der Kulturen wurden die Membranen anhand von Ultrazentrifugation isoliert. Die Varianten der Fusionsprodukte T18-DcuS und T25-DcuS wurden mit 0,5 mM IPTG induziert. Pro Spur wurden isolierte Membranen aus ~400 µg Zellhomogenat aufgetragen. Die Fusionen von DcuS wurden mit DcuS-PAS_p-Antiserum nachgewiesen. (1) T18-DcuS(Wt): pMW429; (2) T18-DcuS(G190A/G194A): pMW1212; (3) T25-DcuS(G190A/G194A): pMW1211; (4) T25-DcuS(Wt): pMW426; (5) JM109

4.2.2.5 GALLEX: Homodimerisierung von TM1 und TM2

Die BACTH-Studien haben gezeigt, dass Austausch im SxxxGxxxG-Motiv der Transmembranhelix 2 die Dimerisierung des DcuS Homodimers stören. Vor allem muss hier die Mutation G190A/G194A hervorgehoben werden. Bei ihr korreliert der beträchtliche Funktionsverlust von DcuS mit einer erheblichen Beeinträchtigung der Homodimerisierung der Sensorkinase. Zudem konnte für Substitution S186C/G190A, die ebenfalls die Funktion des Sensors DcuS stark inhibiert, eine Fumarat-induzierte Dimerisierungsstörung nachgewiesen werden. In weiteren Versuchen sollte gezielt auf die Dimerisierung der

einzelnen Transmembrandomänen eingegangen werden. Deshalb wurde die Homoassoziation von TM1 sowie TM2 isoliert von den anderen Domänen des Sensors DcuS im GALLEX-System (Schneider & Engelman 2003) betrachtet.

Das GALLEX-System ermöglicht Studien zur Homo- und Heterodimerisierung von einzelnen TMs. Dabei wird die Transmembranhelix der Wahl am N-Terminus mit der DNA-Bindedomäne des Repressors LexA und C-terminal mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP) gekoppelt. Solche Chimären können im Reporterstamm SU101 (Dmitrova et al. 1998) auf Homodimerisierung untersucht werden (Abb. E33). Im Stamm SU101 steht das *lacZ* Gen unter der Kontrolle des *sulA* Operators, welcher durch LexA-Dimere reprimiert wird. Durch die Dimerisierung der TMs bilden sich LexA-Dimere und diese unterdrücken die Expression von *lacZ*. Diese Inhibition der Expression von *lacZ* kann anhand der β -Galactosidaseaktivität bestimmt werden und gilt als Maß für die Dimerisierung der Transmembranhelices.

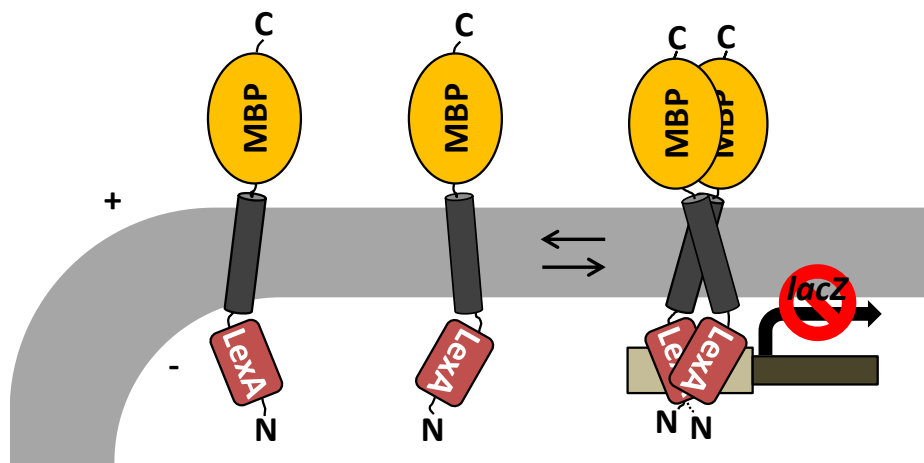


Abb. E33: Schematische Darstellung der GALLEX-Homodimerisierung. Die Transmembranhelices sind am N-Terminus mit dem DNA-Bindeprotein LexA gekoppelt und C-terminal mit MBP fusioniert. Bei Interaktion der Transmembrandomänen bindet der LexA Dimer an den Operator des Reporterstammes und reprimiert die Expression von *lacZ*.

Die einzelnen LexA-Monomere müssen in korrekter Orientierung zueinander vorliegen um als Dimere an den Operator des Stammes SU101 binden zu können. Nur so sind sie in der Lage die Expression des Reportergens *lacZ* zu inhibieren. Deshalb muss im GALLEX-System die optimale Länge einer jeden Helix für die Messungen bestimmt werden. Infolgedessen mussten zuerst die optimalen Transmembranhelixlängen von TM1 und TM2 bestimmt werden. Die Verkürzungen wurden so gewählt, dass die SmallxxxSmall-Motive der beiden

TMs möglichst zentral liegen. Die variierenden TM1- und TM2-Varianten wurden mittels PCR amplifiziert und anhand der Schnittstellen *SacI* und *SpeI* in Plasmid pBLM100 integriert.

Die Untersuchungen zur Bestimmung der optimalen Helixlängen von Transmembranhelices 1 und 2 sind in Abbildung E34A dargestellt. Zusätzlich sind die Sequenzen sowie die Verkürzungen der Transmembrandomänen angegeben (Abb. 34B). Der Aminosäurerest G83 der TM von GpA ist durch einen Unterstrich gekennzeichnet. Die schwächste gemessene Wechselwirkung im GALLEX-System wurde auf 0 % gesetzt und alle weiteren Werte dementsprechend standardisiert. Das $TM_{GpA[17]}$ -Konstrukt, welches die auf 17 Aminosäuren verkürzte Transmembranhelix von GpA enthält, dient bei diesen Studien als Kontrolle für starke Homodimerisierung. Die Mutation G83I dieses Konstrukts hingegen wird aufgrund der erheblichen Beeinträchtigung der Interaktion als Vergleichswert für schwache Wechselwirkungen herangezogen. Sowohl bei TM1 als auch bei TM2 weisen Helixlängen von 16 Aminosäuren die stärkste Interaktion auf. Der Vergleich der Konstrukte $TM1_{DcuS[16]}$ und $TM2_{DcuS[16]}$ verdeutlicht aber, dass das TM2-Konstrukt viel stärker dimerisiert. So ist die Homoassoziation von $TM2_{DcuS[16]}$ mit 44 % mehr als doppelt so hoch. Die Homodimerisierung von $TM1_{DcuS[16]}$ liegt andererseits mit 20 % nur geringfügig über der Kontrolle für schwache Interaktion $TM_{GpA[17]}(G83I)$. Auf jeden Fall weisen die GALLEX-Studien der TM1 und TM2 auf die Homodimerisierung der jeweiligen Transmembrandomäne hin.

In weiterführenden Versuchen wurde der Einfluss der Substitutionen S186C/G190A und G190A/G194A auf die Homodimerisierung des $TM2_{DcuS[16]}$ -Konstrukts untersucht. Die Transmembranhelices mit diesen Substitutionen wurden aus den Plasmiden pMW809 (DcuS(186C/G190A)) und pMW813 (DcuS(G190A/G194A)) anhand von PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *SpeI* in den Vektor pBLM100 kloniert.

Die Mutationen S186C/G190A und G190A/G194A beeinflussen die Homodimerisierung des GALLEX-Konstrukt $TM2_{DcuS[16]}$ in beträchtlichem Maße (Abb. E35). Die Interaktion beider liegt weit unter der Kontrolle für schwache Interaktion $TM_{GpA[17]}(G83I)$ und $TM1_{DcuS[16]}$. Bei Variante $TM2_{DcuS[16]}(G190A/G194A)$ wird das *lacZ* Gens des Reporterstammes SU101 von allen untersuchten Ansätzen am wenigsten reprimiert. Deshalb wurde dessen Homodimerisierung auf 0 % gesetzt und die Werte aller anderen Ansätzen dementsprechend standardisiert. Die Homoassoziation der Variante $TM2_{DcuS[16]}(S186C/G190A)$ ist im Vergleich zum wildtypischen Konstrukt $TM2_{DcuS[16]}(Wt)$ mit nur noch 4 % ebenfalls erheblich

beeinträchtigt. Die beiden Aminosäureaustausche S186C/G190A und G190A/G194A stören die Interaktion zwischen TM2-TM2 so gravierend, dass diese nahezu vollkommen aufgehoben wird.

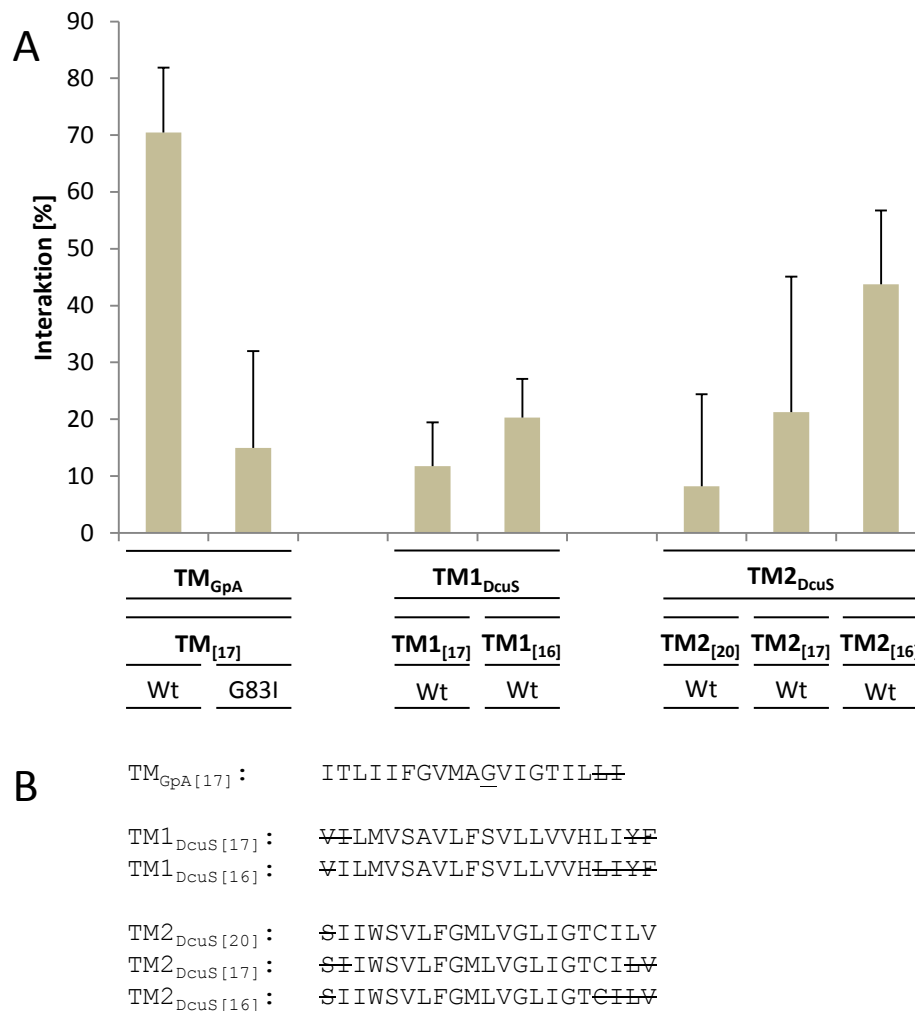


Abb. E34: Bestimmung der optimalen Länge von TM1 und TM2 für die GALLEX-Konstrukte. Der Stamm SU101 wurde mit den TM-Konstrukten (siehe unten) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,6. Die Fusionsprodukte der Transmembranhelices wurden durch 5 µM IPTG exprimiert. (A) Die Homodimerisierung der TM-Konstrukte unterschiedlicher Länge wurde anhand der β-Galactosidaseaktivität bestimmt. Die β-Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die schwächste gemessene Interaktion im GALLEX-System wurde auf 0 % gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die Konstrukte TM_{GpA}[17](Wt) und TM_{GpA}[17](G83I) dienten als Kontrollen für Interaktion im GALLEX-System. (B) Sequenz der Transmembranhelices von Glycophorin A (TM_{GpA}) sowie TM1 (TM1_{DcuS}) und TM2 (TM2_{DcuS}) von DcuS. Die Verkürzungen der Helices sind durch die durchgestrichenen Aminosäuren gekennzeichnet. Die Position von G83 ist in der Sequenz von TM_{GpA} unterstrichen. Konstrukte: TM_{GpA}[17](Wt): pBLM-GpA; TM_{GpA}[17](G83I): pBLM-GpA-G83I; TM1_{DcuS}[17](Wt): pMW1967; TM1_{DcuS}[16](Wt): pMW1968; TM2_{DcuS}[20](Wt): pMW1960; TM2_{DcuS}[17](Wt): pMW1961; TM2_{DcuS}[16](Wt): pMW1963.

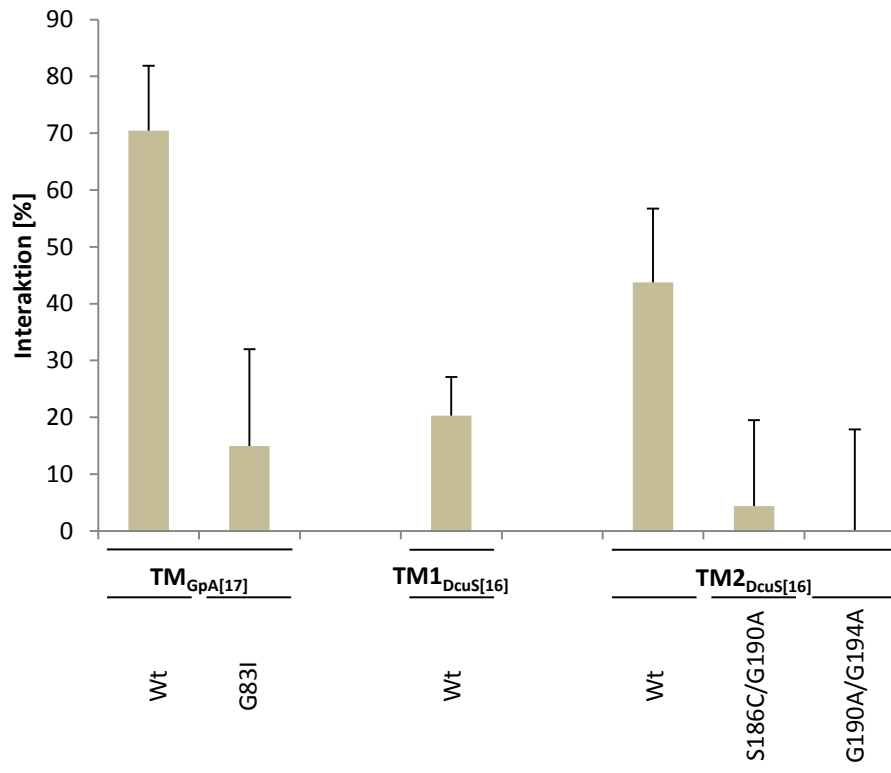


Abb. E35: Homodimerisierung TM1_{DcuS[16]} und TM2_{DcuS[16]}. Der Stamm SU101 wurde mit GALLEX-Konstrukten von TM1_{DcuS[16]} und TM2_{DcuS[16]} (siehe unten) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C. Die Fusionsprodukte der Transmembranhelices wurden durch 5 µM IPTG exprimiert. Die Homodimerisierung der TM-Konstrukte wurde anhand der β-Galactosidaseaktivität bestimmt. Die β-Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Dimerisierung von TM2_{DcuS[16]}(G190A/G194A) wurde auf 0 % gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die Konstrukte TM_{GpA[17]}(Wt) und TM_{GpA[17]}(G83I) dienen als Kontrollen für Interaktion im GALLEX-System. Konstrukte: TM_{GpA[17]}(Wt): pBLM-GpA; TM_{GpA[17]}(G83I): pBLM-GpA-G83I; TM1_{DcuS[16]}(Wt): pMW1968; TM2_{DcuS[16]}(Wt): pMW1963; TM2_{DcuS[16]}(S186C/G190A): pMW1965; TM2_{DcuS[16]}(G190A/G194A): pMW1964.

4.2.2.6 GALLEX: Expressions-, Membranintegrations- und Orientierungskontrollen der TM2-Konstrukte

Die C-terminale MBP-Domäne der GALLEX-Konstrukte ermöglicht es, die Expression, Membranintegration und Orientierung der Chimärenproteine zu kontrollieren. Die erstellten TM1- und TM2- Konstrukte wurden diesen Analysen unterzogen, um die Ergebnisse der Homodimerisierung dieser Konstrukte zu verifizieren. Hier wird nur auf die Kontrollen des TM2_{DcuS[16]}(Wt)-Konstrukts sowie dessen Varianten TM2_{DcuS[16]}(S186C/G190A) und TM2_{DcuS[16]}(G190A/G194A) eingegangen. Die Analysen aller weiteren GALLEX-Konstrukte sind im Anhang zusammengefasst (Abb. A21-24).

Die Expression der TM2_{DcuS[16]}-Varianten wurde mit 200 µg Gesamtprotein nach SDS-Gelelektrophorese und dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mit MBP-Antiserum nachgewiesen.

Alle TM2_{DcuS[16]}-Konstrukte können bei dem berechneten Molekulargewicht von 54 kDa auf dem Immunoblot mit MBP-Antiserum nachgewiesen werden (Abb. E36). Dieses Laufverhalten entspricht den Beobachtungen ähnlicher GALLEX-Konstrukte (Schneider & Engelman 2003) und liegt deutlich über dem berechneten Molekulargewicht von wildtypischem MBP (43,4 kDa). Unterschiede in der Expressionsstärke der Varianten kommen ebenfalls nicht vor.

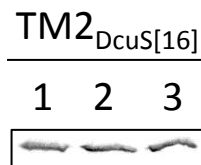


Abb. E36: Expressionsnachweis der TM2_{DcuS[16]}-Konstrukte. Der Stamm SU101 wurde mit Derivaten des Plasmids pBLM100 (LexA(-)-MBP) transformiert. Die Kultivierung erfolgte aerob in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,6. Die Varianten des Fusionsproduktes von TM2_{DcuS[16]} wurden mit 5 µM IPTG induziert. Pro Spur wurden 200 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Konstrukte wurden mit MBP-Antiserum nachgewiesen. (1) TM2_{DcuS[16]}(Wt): pMW1963; (2) TM2_{DcuS[16]}(G190A/G194A): pMW1964; (3) TM2_{DcuS[16]}(S186C/G190A): pMW1965

Die Membranintegration der TM2_{DcuS[16]}-Konstrukte wurde wie beim Expressionsnachweis mit MBP-Antiserum auf einem Westernblot überprüft. Dazu wurden die GALLEX-Konstrukte von ihren Plasmiden mit 5 µM IPTG induziert. Von jedem Stamm wurde das Gesamtprotein sowie die löslichen Proteine und Membranproteine mittels NaOH-Extraktion und Proteinfällung mit Trichloressigsäure isoliert (Chen & Kendall 1995). Die gefällten Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Bei allen drei TM2_{DcuS[16]}-Konstrukten befinden sich die exprimierten Chimären fast ausschließlich unter den isolierten Membranproteinen (Abb. E37). Lediglich vernachlässigbare Mengen der GALLEX-Konstrukte kommen in der löslichen Proteinfraction vor. Obendrein sind die untersuchten GALLEX-Konstrukte in gleichen Mengen in der Membranfraktion und im Gesamtprotein enthalten. Dies spricht für eine Integration der Konstrukte in der Membran.

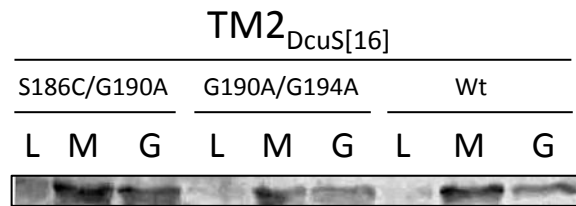


Abb. E37: Membranintegration der TM2_{DcuS[16]}-Konstrukte. Der Stamm NT326 wurde mit Derivaten des Plasmids pBLM100 (LexA(-)-MBP) transformiert. Die Kultivierung erfolgte aerob in LB Medium bei 30°C bis in die exponentielle Phase. Die Varianten des Fusionsproduktes von TM2_{DcuS[16]} wurden mit 5 µM IPTG induziert. Pro Spur wurden die löslichen Proteine (L), die Membranproteine (M) oder das Gesamtprotein (G) aus 1 ml Kultur aufgetragen. Die Konstrukte wurden mit MBP-Antiserum nachgewiesen. Konstrukte: TM2_{DcuS[16]}(Wt): pMW1963; TM2_{DcuS[16]}(G190A/G194A): pMW1964; TM2_{DcuS[16]}(S186C/G190A): pMW1965.

Die Orientierung der GALLEX-Konstrukte kann per Wachstumstests mit dem MBP-defizienten Stamm NT326 (Treptow & Shuman 1985) kontrolliert werden. Die Chimärenproteine sind nur dann in der Lage den MBP-Defekt des Stammes NT326 zu komplementieren, wenn die MBP Domäne im Periplasma liegt. Die Wachstumskomplementation mit den TM2_{DcuS[16]}-Konstrukten erfolgte mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle.

Die Wachstumsexperimente der TM2_{DcuS[16]}-Konstrukte bestätigen, dass diese in der Lage sind die MBP-Defizienz von NT326 zu komplementieren (Abb. E38: 2-4). Stamm NT326 ohne GALLEX-Konstrukte ist wiederum nicht wachstumsfähig (Abb. E38: 1). Diese Ergebnisse bescheinigen die korrekte Orientierung der TM2_{DcuS[16]}-Konstrukte in der Membran. Die N-terminale LexA-Domäne liegt im Cytoplasma und das Maltose-Bindeprotein im Periplasma.



Abb. E38: Wachstumskomplementation des MBP-defizienten Stammes NT326 mit den TM2_{DcuS[16]}-Konstrukten. Der Stamm NT326 (MBP-) wurde mit Derivaten des Plasmids pBLM100 (LexA(-)-MBP) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte aerob bei 37°C auf M9-Agarplatten. Als Kohlenstoffquelle diente Maltose (0,4%) und die Konstrukte wurden mit IPTG (0,02%) induziert. (1) MBP-: NT326; (2) TM2_{DcuS[16]}(S186C/G190A): pMW1965; (3) TM2_{DcuS[16]}(G190A/G194A): pMW1964; (4) TM2_{DcuS[16]}(Wt): pMW1963

4.2.2.7 Modifiziertes BACTH-System: Heterodimerisierung von TM1 mit TM2

Das GALLEX-System ermöglicht zwar die Analyse der Heterodimerisierung von zwei Transmembrandomänen, diese müssen jedoch in diesem System die gleiche Orientierung besitzen. Da TM1 und TM2 gegenläufige Orientierungen aufweisen, konnte die Heterodimerisierung dieser Transmembranhelices mit diesem System nicht überprüft werden. [REDACTED] der AG [REDACTED] hat ein System entwickelt, bei dem die Heterodimerisierung von Transmembranhelices antiparalleler Orientierung erforscht werden kann. Dieses System (Steindorf unveröffentlicht) beruht auf dem BACTH-System von Karimova et al. (1998; 2005). Die Interaktion der Transmembrandomänen wird durch C- bzw. N-terminale Fusionen mit T18 und T25 untersucht. Analog zum GALLEX-System ist an das entgegengesetzte Ende der Transmembranhelices das Maltose-Bindeprotein gekoppelt. Die Dimerisierung solcher Konstrukte kann dann genauso wie im BACTH-System im *cyd*-defizienten Stamm BTH101 überprüft werden. Die Rekonstitution der Adenylatcyclase in diesem Stamm kann anhand der β -Galactosidaseaktivität bestimmt werden und gilt als Maß für die Interaktion.

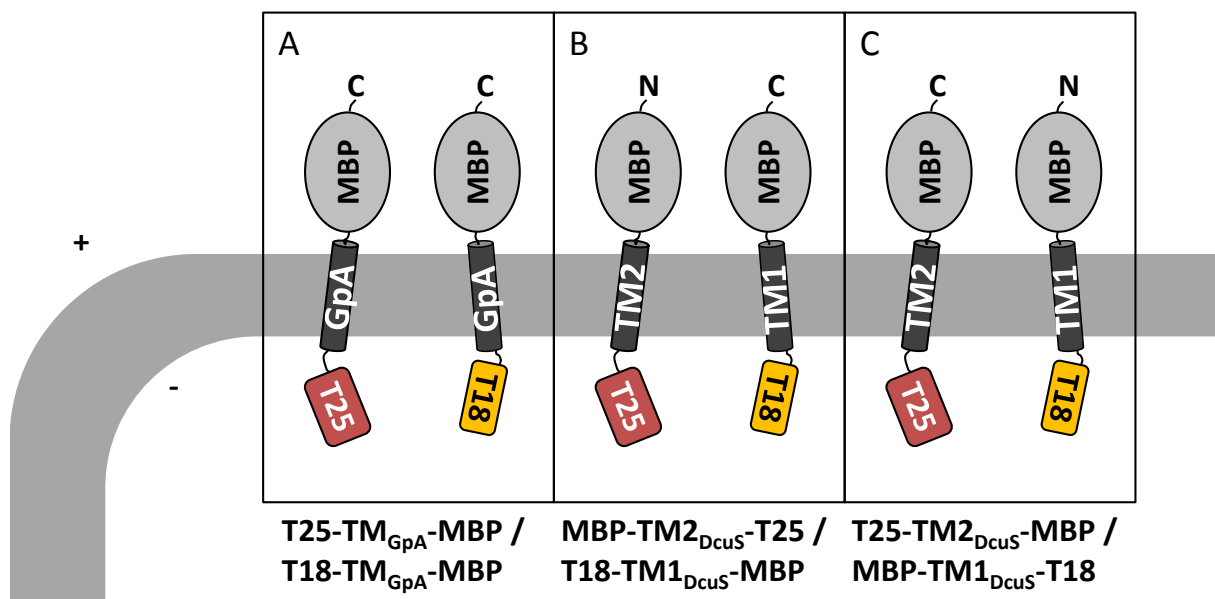


Abb. E39: Schematische Darstellung der Heterodimerisierung von TM1 mit TM2 im modifizierten BACTH-System. (A) Kontrolle für starke Interaktion: T18-TMGpA-MBP (pALT18iiGpA) und T25-TMGpA-MBP (pBLT25iiGpA). Konstrukte zur Bestimmung der Heterodimerisierung von TM1 und TM2 in physiologischer (B) sowie seitenverkehrter (C) Orientierung: (B) T18-TM1_{DcuS}-MBP (pALT18iiDcuSTMD1a) mit MBP-TM2_{DcuS}-T25 (pBMT25iiDcuSTMD2b) bzw. (C) MBP-TM1_{DcuS}-T18 (pAMT18iiDcuSTMD1a) mit T25-TM2_{DcuS}-MBP (pBLT25iiDcuSTMD2b).

Die TM1- und TM2-Konstrukte wurden von [REDACTED] hergestellt und von ihm getestet. In diesen Konstrukten wurden zusätzlich zu den Transmembranhelices Abschnitte von 20 Aminosäuren vor und von 19 Aminosäuren hinter TM1 bzw. TM2 eingefügt. Eine Auswahl der überprüften Kombinationen ist in Abbildung E39 schematisch dargestellt. Die T18- und T25-Konstrukte von TM1 und TM2 wurden in den Reporterstamm BTH101 transformiert und mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden aerob in LB-Medium gezüchtet. Die Dimerisierung der TMs wurde anhand der β -Galactosidaseaktivität überprüft.

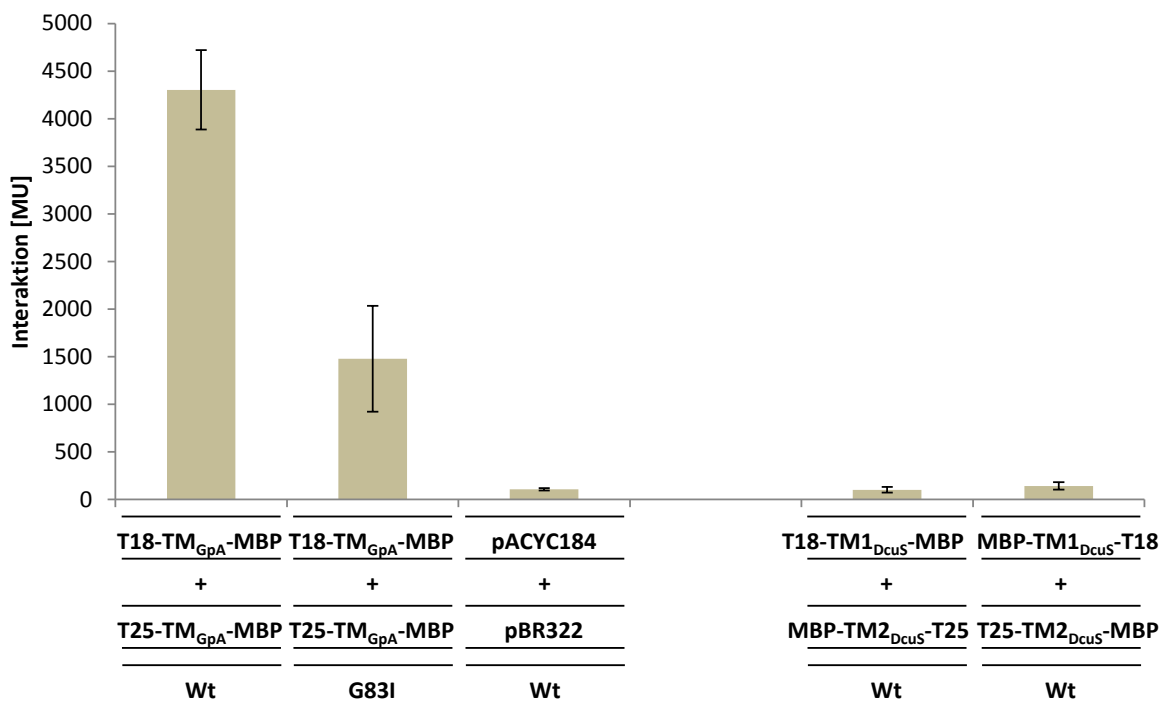


Abb. E40: Interaktion zwischen TM1 und TM2 im modifizierten BACTH-System. Der Stamm BTH101 wurde mit den Derivaten der Plasmide pACYC184 und pBR322 (siehe unten) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium. Die Varianten der Fusionsprodukte von T18 und T25 wurden mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Heterodimerisierung der TM-Konstrukte wurde an Hand der β -Galactosidaseaktivität bestimmt. Die Kombinationen von T18-TM_{GpA}-MBP mit T25-TM_{GpA}-MBP dienen als Kontrollen für Interaktion. Die Plasmide pACYC184 und pBR322 ohne T18 und T25 weisen die Hintergrundinteraktion auf. Die Versuche wurden durch [REDACTED] durchgeführt. T18-Fusionen: T18-TM_{GpA}-MBP(Wt): pALT18iiGpA; T18-TM_{GpA}-MBP(G83I): pALT18iiGpA-G83I; T18-TM1_{DcuS}-MBP(Wt): pALT18iiDcuSTMD1(a); MBP-TM1_{DcuS}-T18(Wt): pAMT18iiDcuSTMD1(a). T25-Fusionen: T25-TM_{GpA}-MBP(Wt): pBLT25iiGpA; T25-TM_{GpA}-MBP(G83I): pBLT25iiGpA-G83I; MBP-TM2_{DcuS}-T25(Wt): pBMT25iiDcuSTMD2(b); T25-TM2_{DcuS}-MBP(Wt): pBLT25iiDcuSTMD2(b).

Die Versuche zur Heterodimerisierung von TM1 und TM2 sind in Abbildung E40 zusammengefasst. Die Homodimerisierung der Transmembrandomäne von GpA sowie deren Variante G83I dienen als Kontrollen für Interaktion des modifizierten BACTH-Systems. Die Kombination der leeren Vektoren pACYC184 und pBR322 hingegen gibt die Hintergrundaktivität an. Sowohl in der physiologischen entgegengesetzten Orientierung von

TM1 und TM2 der Kombination T18-TM1_{DcuS}-MBP mit MBP-TM2_{DcuS}-T25 (Abb. E39B) als auch in der seitenverkehrten Orientierung des Ansatzes MBP-TM1_{DcuS}-T18 mit T25-TM2_{DcuS}-MBP (Abb. E39C) ist keine Heterodimerisierung von TM1 und TM2 messbar. Die Interaktion beider Kombinationen liegt lediglich auf dem Niveau der Hintergrundaktivität. Diese Ergebnisse sind jedoch nur schwer zu beurteilen, da ein Expressionsnachweis der Konstrukte mittels MBP-Antiserum bislang nicht möglich ist. Sogar bei den Konstrukten von GpA, die sehr stark wechselwirken, schlug dieser Nachweis bisher fehl. So könnte die fehlende Interaktion von TM1 mit TM2 auch das Resultat von schwacher Expression der Konstrukte bzw. Instabilität der Konstrukte sein.

4.3 Lokalisierung des DctA/DcuS-Sensorkomplexes sowie assoziierter Komponenten

Bakterien besitzen keine Organellen, aber einige Proteine zeigen eine komplexe, räumliche Lokalisierung in der Zelle. Die Organisation einzelner Proteine in supramolekulare Cluster konnte für Enzyme der Atmungskette, des Tricarbonsäurezykluses sowie Transportmetabolons gezeigt werden (Lenn et al. 2008; Sousa et al. 2011; Meyer et al. 2011; Moraes & Reithmeier 2012). Eine vergleichbare supramolekulare Organisation kommt auch in den bakteriellen Sensorkomplexen der Methyl-akzeptierenden Chemotaxisproteine (MCPs) vor (Sourjik & Berg 2000). Die polaren MCP-Cluster dienen dort vermutlich der Signalintegration und Steigerung der Sensitivität der Sensoren (Kentner et al. 2006; Thiem & Sourjik 2008). Die Sensorkinasen TorS und EvgS aus *E. coli*, PleC und DivJ aus *Caulobacter crescentus*, sowie Walk(YycG) aus *Bacillus subtilis* treten ebenso in Clustern an den Zellpolen bzw. dem Zellseptum auf (Sommer et al. 2013; Shapiro et al. 2002; Paul et al. 2008; Fukushima et al. 2008; Fukushima et al. 2011). Andererseits weisen die membrangebundenen Histidinkinasen CitS aus *Bacillus subtilis*, LuxQ aus *Vibrio harveyi*, PhoQ aus *Salmonella enterica* und KdpD aus *E. coli* entweder homogene oder heterogene Distributionen in der gesamten Zelle auf (Meile et al. 2006; Neiditch et al. 2006; Sciara et al. 2008; Maier et al. 2008).

Für die beiden Histidinkinasen CitA und DcuS konnten anhand von YFP-Fusionen polare Cluster in der Membran von *E. coli* nachgewiesen werden (Scheu et al. 2008). Dabei erfolgte die polare Anreicherung des metabolischen Sensors DcuS auch in Abwesenheit der MCPs sowie der DcuS-assozierten Proteine DcuR, DctA und CitA (Scheu unveröffentlicht). Allgemeine zelluläre Faktoren wie Zellkrümmung, Cardiolipingehalt der Zellpole, Zellteilungsmaschinerie und das Zytoskelettprotein MreB konnten ebenso als Gründe für die polare Lokalisierung von DcuS-YFP ausgeschlossen werden.

Der aerobe C₄-Dicarbonsäure-Transporter DctA, welcher zusammen mit DcuS den DctA/DcuS-Sensorkomplex bildet, kann hingegen in der gesamten Membran nachgewiesen werden (Witan 2012). Eine funktionale DctA-YFP Fusion zeigt in fluoreszenzmikroskopischen Studien heterogen verteilte Cluster. Ein Vergleich der Lokalisierung von YFP (Abb. E41A), DcuS-YFP (Abb. E41B) und DctA-YFP (Abb. E41C) in *E. coli* ist in Abbildung E41 zusammengefasst.

Die zelluläre Lokalisierung des Antwortregulators DcuR und des Transporters DauA, die mit den Komponenten DcuS bzw. DctA des Sensorkomplexes assoziiert sind, ist unbekannt. In den folgenden Untersuchungen sollten die Proteine DcuR und DauA auf ihre zelluläre Distribution überprüft werden. Zusätzlich wurde die Lokalisierung der assoziierten Komponenten des DctA/DcuS-Sensorkomplexes in Abwesenheit sowie in Koexpression mit DcuS untersucht.

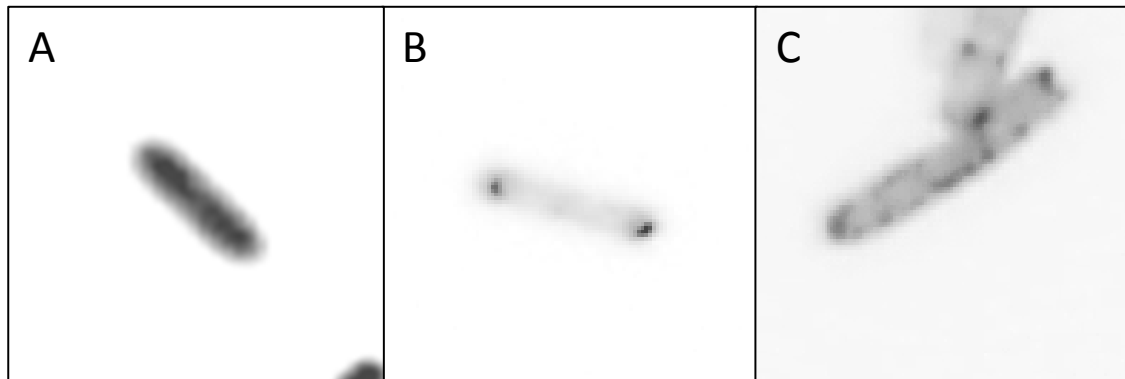


Abb E41: Übersicht der zellulären Anreicherung von YFP (A), DcuS-YFP (B) und DctA-YFP (C). Die YFP-Fusionen (siehe unten) wurden in *E. Coli* transformiert und exprimiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C. (A) YFP(Wt): pEYFP; (B) DcuS-YFP(Wt): pMW407; (C) DctA-YFP(Wt): pMW526

4.3.1 Der Antwortregulator DcuR

4.3.1.1 Zelluläre Anreicherung von YFP-Fusionen des Antwortregulators DcuR

Der Antwortregulator DcuR des DcuSR-Zweikomponentensystems aktiviert im phosphorylierten Zustand unter anderem die Expression der Gene des C₄-dicarbonsäure-Metabolismus (Zientz et al. 1998; Golby et al. 1999; Oshima et al. 2002). Dieser Transkriptionsfaktor besteht aus einer N-terminalen Empfängerdomäne mit dem konservierten Aspartatrest 56 und einem C-terminalen „Helix-Turn-Helix“-DNA-Bindemotiv. Der Phosphorylgruppentransfer von DcuS auf den konservierten Aspartatrest von DcuR bewirkt die Dimerisierung von DcuR (Janausch et al. 2002b; Janausch et al. 2004; Abo-Amer et al. 2004). Die DNA-Bindung des phosphorylierten DcuR-Dimers erfolgt an einem AT-reichen, hexameren DNA-Wiederholungsmotiv.

Für die Lokalisierungsstudien von DcuR wurden drei unterschiedliche YFP-Fusionen des Antwortregulators erstellt. Einerseits wurde YFP direkt C- und N-terminal genetisch mit DcuR gekoppelt. Andererseits wurde unter Berücksichtigung der Topologie von DcuR ein

flexibler Linkerbereich zwischen YFP und DcuR eingefügt. Mit dieser Strategie sollte eine mögliche Beeinträchtigung der N-terminalen Empfängerdomäne bzw. der C-terminalen DNA-Bindedomäne durch YFP minimiert werden und die Chance einer funktionalen Fusion gesteigert werden. Bei diesem Konstrukt YFP-linker-DcuR wurde außerdem die monomere Form von YFP durch den Aminosäureaustausch A206K (Zacharias et al. 2002) erstellt. Die zelluläre Lokalisierung der Fusionen DcuR-YFP, YFP-DcuR und YFP(A206K)-linker-DcuR wurde *in vivo* anhand von Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Fusionsprodukte wurden durch die pMW643-Derivate (Scheu et al. 2010a) in den DcuR-defizienten *E. coli* Stamm IMW238 (Zientz et. al 1998) transformiert und mit L-Arabinose induziert.

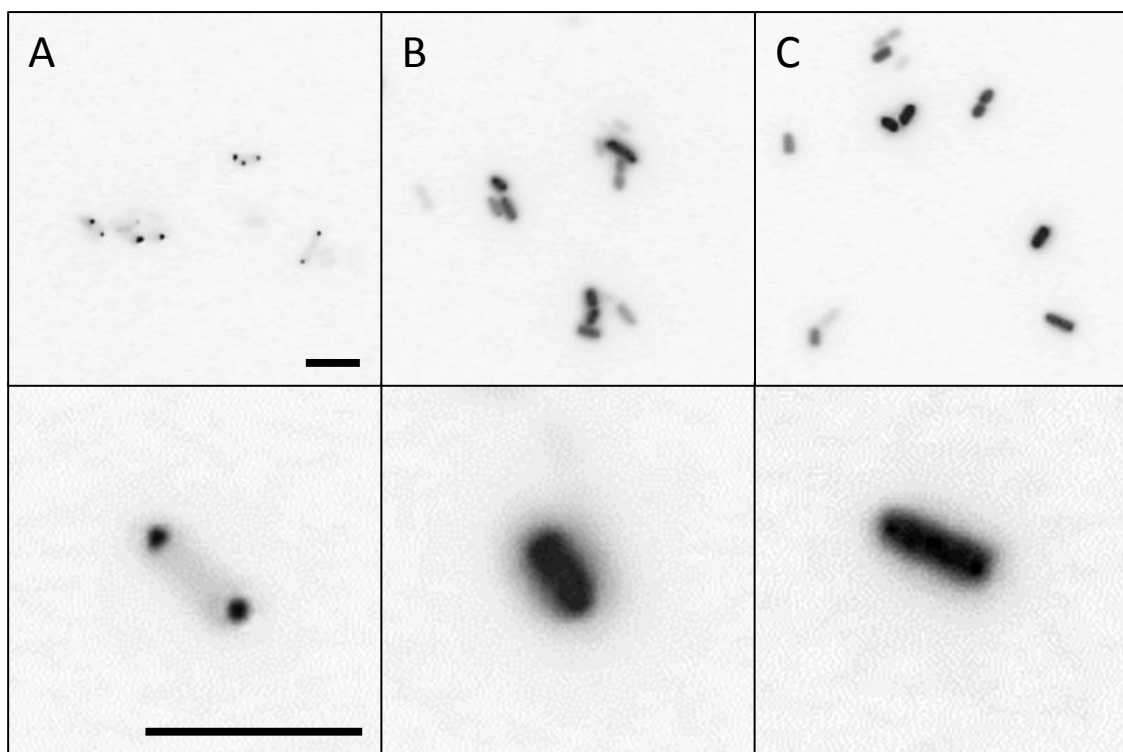


Abb. E42: Vergleich der Lokalisierung von DcuR-YFP (A), YFP-DcuR (B) und YFP(A206K)-linker-DcuR (C). Die YFP-Fusionen (siehe unten) wurden in *E. coli* Stamm IMW238 (DcuR-) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 - 0,8. Anschließend wurden die Fusionen mit 133 μ M L-Arabinose für 1 Stunde induziert. Die obere Bilderreihe zeigt Übersichtsaufnahmen, die untere Nahaufnahmen. Die schwarzen Skalierungsbalken betragen 5 μ M. Fusionen: (A) DcuR-YFP(Wt): pMW1739; (B) YFP-DcuR(Wt): MW1741; (3) YFP(A206K)-linker-DcuR: pMW1953.

In Abbildung E42 sind die zellulären Distributionen der Fusionen DcuR-YFP (Abb. E42A), YFP-DcuR (Abb. E42B) und YFP(A206K)-linker-DcuR (Abb. E42C) gegenüber gestellt. Die obere Bilderreihe zeigt Übersichtsaufnahmen mehrerer Zellen und die untere Bilderreihe Nahaufnahmen einzelner Zellen. Beim Vergleich der DcuR-Fusionen fällt auf, dass DcuR-YFP im Gegensatz zu den anderen beiden Fusionen nur Fluoreszenz an den Zellpolen aufweist. In

den Stämmen der Fusionsprodukte YFP-DcuR und YFP(A206K)-linker-DcuR andererseits fluoreszieren die gesamten Zellen. Verteilungen dieser Art sind typisch für cytoplasmatische Lokalisierung. Demnach besitzen die Fusionen YFP-DcuR sowie YFP(A206K)-linker-DcuR homogene Verteilungen und DcuR-YFP polare Cluster im Cytoplasma.

4.3.1.2 Funktionsnachweis der YFP-Fusionen des Antwortregulators DcuR

Das DcuSR-System kontrolliert unter anaeroben Bedingungen die Expression der Gene des C₄-Dicarboxylat-Stoffwechsels (Zientz et al. 1998). Die Expression der Zielgene hängt dabei direkt von der Funktion des Transkriptionsfaktors DcuR ab. Deshalb können *dcuB-lacZ* Reporterfusionen für den Funktionsnachweis von DcuR verwendet werden. Der Stamm IMW238 (Zientz et al. 1998) besitzt eine chromosomale *dcuB-lacZ* Reporterfusion sowie die Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette in *dcuR*. Die Komplementation der DcuR-Defizienz dieses Stammes wurde mit den DcuR-Fusionen DcuR-YFP, YFP-DcuR und YFP(A206K)-linker-DcuR sowie wildtypischem DcuR getestet. Der Funktionszustand der DcuR-Fusionen wurde mit Hilfe von β -Galactosidaseaktivitätsmessungen bestimmt und mit Messungen der *dcuR*-wildtypischen Stämme IMW237 (Wt) und IM238 mit pMW1740 (DcuR-pDcuR(Wt)) verglichen.

Die Funktionskomplementation des DcuR-defizienten Stammes IMW238 (DcuR-) mit den YFP-Fusionen von DcuR ist in Abbildung E43 festgehalten. Der DcuR-Defekt von IMW238 (DcuR-) bewirkt, dass auch in Gegenwart des Effektors Fumarat keine Stimulation von *dcuB-lacZ* stattfindet. Das DcuSR-System ist aufgrund des fehlenden Antwortregulators DcuR durchgehend inaktiv. Im Gegensatz dazu führt Fumarat beim *dcuR*-wildtypischen Stamm IMW237 (Wt) zur erheblichen Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ*. Ein vergleichbares Expressionsmuster weist ebenso IMW238 mit pMW1740 (DcuR- pDcuR(Wt)) auf. Der DcuR-Defekt von IMW238 kann also durch plasmidkodiertes DcuR komplementiert werden. Einzig die Fusion YFP(A206K)-linker-DcuR ist in der Lage Stamm IMW238 wiederherzustellen. Die Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ* in Gegenwart von Fumarat entspricht denen der Kontrollen IMW237 (Wt) und IMW238 mit pMW1740 (DcuR- pDcuR(Wt)). Andererseits komplementieren die YFP-Fusionen an C- sowie N-Terminus DcuR-YFP und YFP-DcuR Stamm IMW238 nicht. Die Reporterexpression von *dcuB-lacZ* kann bei diesen durch Fumarat nicht über die Hintergrundexpression angehoben werden.

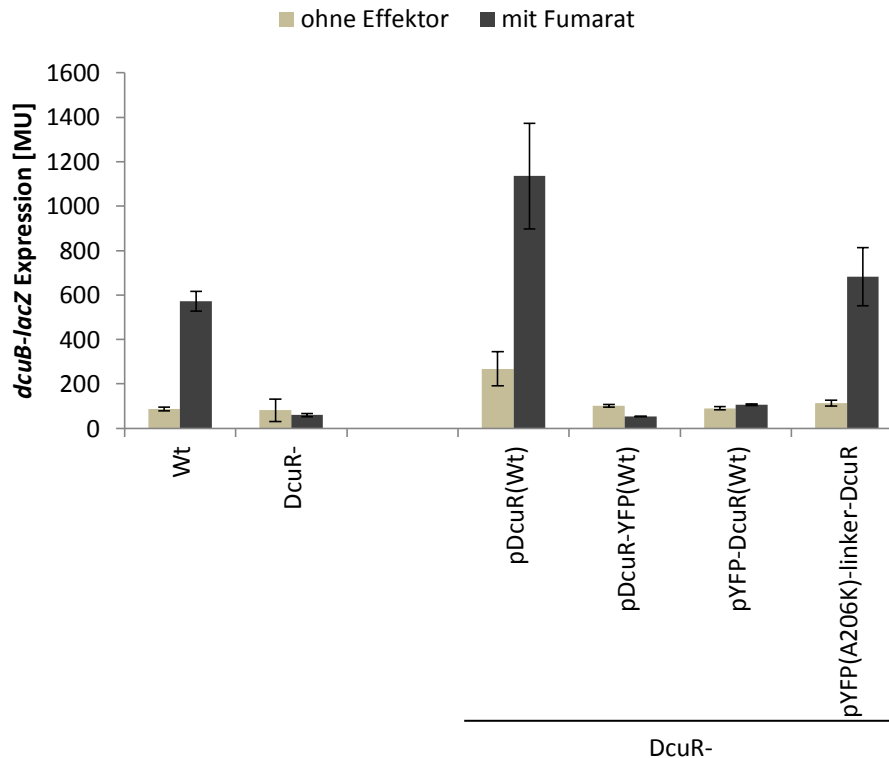


Abb. E43: *dcuB-lacZ* Reportergergenmessungen verschiedener YFP-Fusionen von DcuR im DcuR-defizienten Stamm IMW238. Der DcuR-defiziente Stamm IMW238 (DcuR-) wurde mit den DcuR-Varianten transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die Expression von *dcuB-lacZ* der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige Balken). 20 mM Fumarat wurde als Effektor verwendet (dunkelgraue Balken). Als Positivkontrolle diente *E. coli* Stamm IMW237 (Wt). Wt: IMW237; DcuR-: IMW238; pDcuR(Wt): pMW1740; pDcuR-YFP(Wt): pMW1739; pYFP-DcuR(Wt): pMW1741; pYFP(A206K)-linker-DcuR: pMW1953

4.3.1.3 Wachstumskomplementation durch die DcuR-YFP-Fusionen

Bei aerobem Wachstum in Gegenwart von C_4 -Dicarbonsäuren wird die Expression des Transporters DctA durch den Antwortregulator DcuR des DcuSR-Systems aktiviert (Zientz et al. 1998; Golby et al. 1999). DctA katalysiert dann die Aufnahme von C_4 -Dicarboxylaten wie Fumarat im Symport mit 2 Protonen (Kay & Kornberg 1969; Gutowski & Rosenberg 1975). Die aufgenommenen Substrate werden anschließend im Tricarbonsäurezyklus umgesetzt. Die Expression von DctA und demnach auch das Wachstum mit C_4 -Dicarbonsäuren hängen von der Funktion von DcuR als Transkriptionsfaktor ab. Deshalb wurde zusätzlich zu den Reportergergenmessungen der Funktionszustand der YFP-Fusionen von DcuR in Wachstumsuntersuchungen im DcuR-defizienten Stamm IMW238 (DcuR-) überprüft.

Die Ergebnisse der *dcuB-lacZ* Expressionsstudien werden durch die Wachstumstests bestätigt (Abb. E44). Lediglich Fusion YFP(A206K)-linker-DcuR komplementiert den DcuR-

Defekt von IMW238 (DcuR-) vollständig. Dieser Stamm besitzt vergleichbares Wachstum mit den wildtypischen Kontrollen IMW237 (Wt) und IMW238 pMW1740 (DcuR- pDcuR(Wt)). Die Stämme mit DcuR-YFP und YFP-DcuR wiederum wachsen nur geringfügig besser als IMW238 ohne funktionsfähiges DcuR.

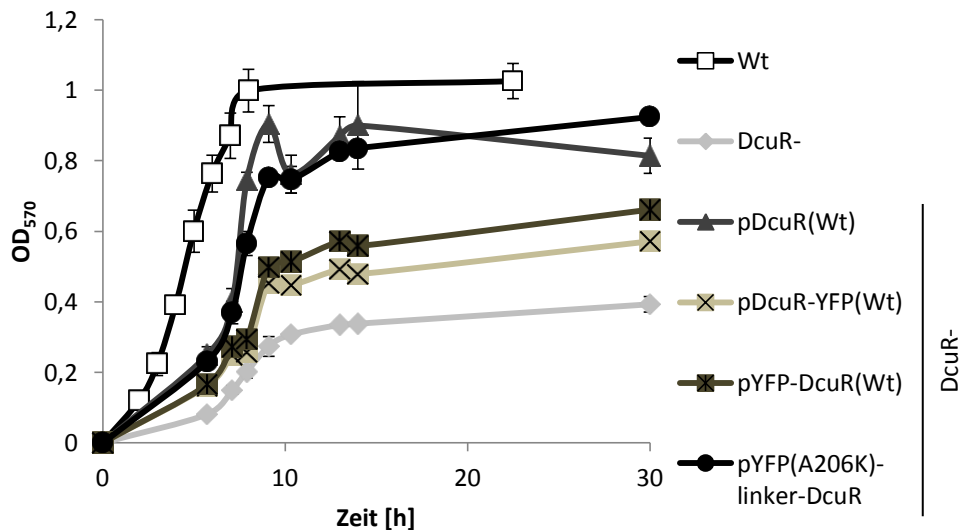


Abb. E44: Wachstumstest der DcuR-Fusionen. Der DcuR-defiziente Stamm IMW238 (DcuR-) wurde mit den DcuR-Varianten transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in eM9-Medium mit 50 mM Fumarat als Wachstumssubstrat. Die optische Dichte OD_{570nm} der Kulturen wurde nach regelmäßigen Abständen bestimmt. Als Positivkontrolle diente *E. coli* Stamm IMW237 (Wt). Wt: IMW237; DcuR-: IMW238; pDcuR(Wt): pMW1740; pDcuR-YFP(Wt): pMW1739; pYFP-DcuR(Wt): pMW1741; pYFP(A206K)-linker-DcuR: pMW1953

4.3.2 Lokalisierung des Transporters DauA in der Zelle

DauA ist ein Mitglied der SLC26/SulP (solute carrier/sulphate transporter) Proteinfamilie (Karinou et al. 2013) und seine Expression ist unabhängig vom DcuSR-System. Gemäß Topologievorhersagen besitzt dieser sekundäre Transporter 12 Transmembranhelices und eine C-terminale STAS (sulphate transporter antagonist of anti-sigma factor)-Domäne. Unter aeroben Bedingungen bei pH 5 löst DauA den aeroben Symporter DctA als Haupttransporter für C_4 -Dicarbonsäuren ab. DauA besitzt jedoch eine schwächere Affinität zu Succinat sowie eine geringere maximale Transportrate im Vergleich zu DctA. Darüber hinaus wirkt sich DauA auf die Expression von DctA aus. Eine Deletion von DauA hat eine verminderte Expression von *dctA* zur Folge. Als möglicher Regulationsmechanismus wird eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen DauA und DctA in Betracht gezogen (Karinou et al. 2013).

Die Lokalisierung des sekundären Transporters DauA wurde mit den Fusionen DauA-YFP(A206K) und YFP(A206K)-DauA fluoreszenzmikroskopisch in *E. coli* Zellen untersucht. Sowohl die C- als auch die N-terminale Fusion von DauA wurde mit der monomeren Mutante YFP(A206K) gekoppelt. Die Verteilung dieser Konstrukte wurde im DauA-negativen Stamm EK1 (Karinou et al. 2013) analysiert.

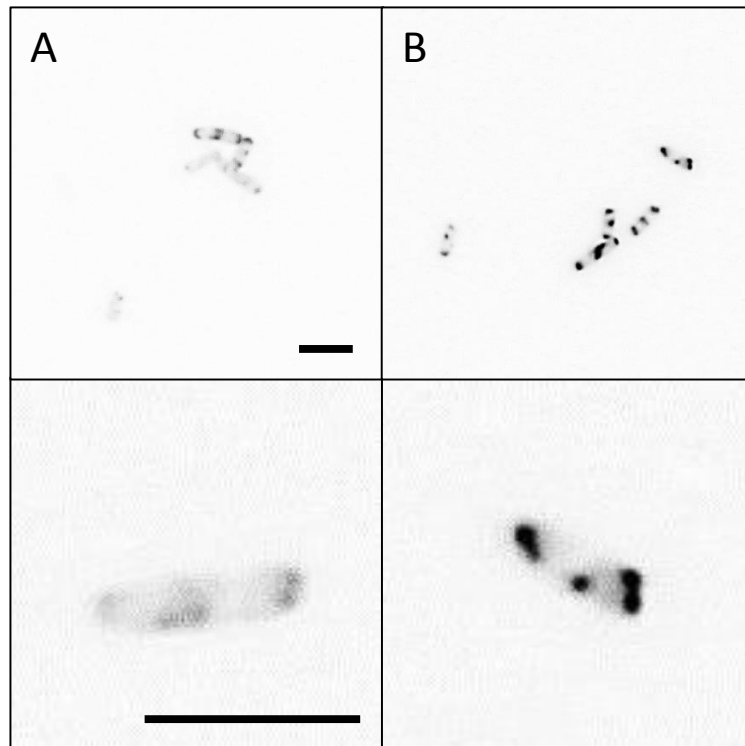


Abb. E45: Vergleich der Lokalisierung von DauA-YFP(A206K) (A) und YFP(A206K)-DauA (B). Die YFP-Fusionen (siehe unten) wurden in Stamm EK1 (DauA-) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,8 - 0,9. Anschließend wurden die Fusionen mit 333 μ M L-Arabinose für 1 Stunde induziert. Die obere Bilderreihe zeigt Übersichtsaufnahmen, die untere Nahaufnahmen. Die schwarzen Skalierungsbalken betragen 5 μ M. Fusionen: (A) DauA-YFP(A206K): pMW1954; (B) YFP(A206K)-DauA: pMW2031.

Beide Fusionen DauA-YFP(A206K) (Abb. E45A) und YFP(A206K)-DauA (Abb. E45B) besitzen ein vergleichbares heterogenes Fluoreszenzmuster. Es treten Fluoreszenzmaxima in Form von Clustern an den Zellpolen und Septen der untersuchten Stämme auf. Die Fluoreszenzintensitäten von DauA-YFP(A206K) und YFP(A206K)-DauA unterscheiden sich jedoch erheblich. Die Fluoreszenz der Fusion YFP(A206K)-DauA ist im Vergleich zu DauA-YFP(A206K) viel stärker. Eine bessere Expression oder Stabilität des YFP(A206K)-DauA-Konstrukts könnte eine mögliche Erklärung für die variierenden Fluoreszenzintensitäten darstellen. Der Funktionszustand der Fusionen YFP(A206K)-DauA und DauA-YFP(A206K) konnte aufgrund eines fehlenden Nachweises nicht gemacht werden.

4.3.3 Die Bedeutung von zellulären Faktoren für die Lokalisierung der Komponenten des Sensorclusters

4.3.3.1 Auswirkungen der monomeren Variante YFP(A206K) sowie der Deletion des Transporters DauA auf die Distribution von DcuS-YFP in der Zelle

Der Grund für die polare Lokalisierung von DcuS ist nicht bekannt (Scheu et al. 2008). Zellspezifische Faktoren wie die Zellkrümmung, Cardiolipingehalt der Polregionen, Zellteilungsmaschinerie sowie das Zytoskelettprotein MreB scheinen keine Rolle bei der Ausbildung der polaren Cluster von DcuS-YFP zu spielen (Scheu unveröffentlicht). Ebenso wenig veränderte sich die Verteilung von DcuS-YFP in der Zelle im DctA-, DcuR-, CitA- oder MCP-negativen Hintergrund. Interessanterweise zeigten die YFP-Fusionen mit DauA ebenfalls polare Anreicherung in *E. coli* Zellen. Ergänzend zu diesen Studien sollten der Einfluss einer Deletion von DauA und die Auswirkung der monomeren Form von YFP(A206K) auf die zelluläre Lokalisierung von DcuS-YFP überprüft werden. Dafür wurde die Mutation A206K in pMW407 (DcuS-YFP(Wt)) mittels zielgerichteter Mutagenese integriert. Die zelluläre Verteilung der DcuS-YFP-Derivate wurde in JM109 bzw. EK1 (DauA-) fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

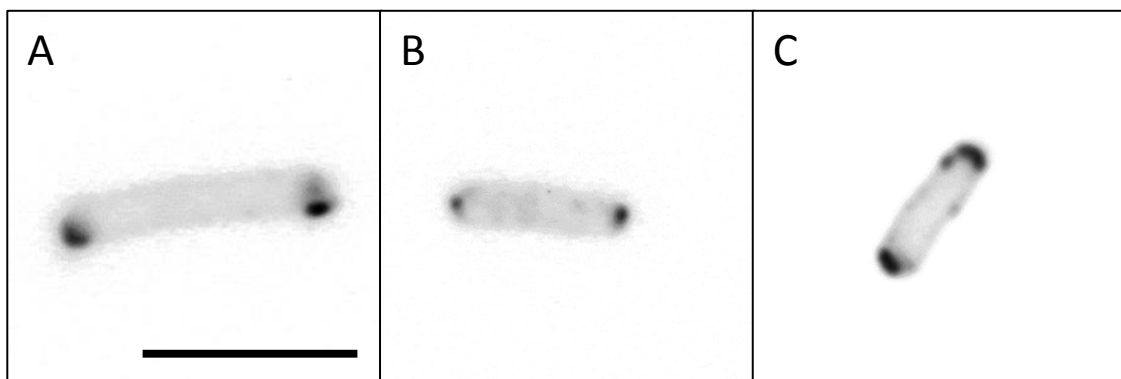


Abb. E46: Vergleich der Lokalisierung von DcuS-YFP(Wt) (A) mit DcuS-YFP(A206K) (B) sowie die Anreicherung von DcuS-YFP im DauA-negativen Hintergrund (C). Die YFP-Fusionen (siehe unten) wurden in Stamm JM109 bzw. EK1 (DauA-) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 - 0,9. Die Fusionen wurden von Beginn an mit 133 μ M L-Arabinose induziert. Die schwarze Skalierung beträgt 5 μ M. (A) DcuS-YFP(Wt): pMW407 in JM109; (B) DcuS-YFP(A206K): pMW1891 in JM109; (C) DcuS-YFP(Wt): pMW407 in EK1 (DauA-)

Weder die monomere YFP(A206K)-Variante (Abb. E46B) noch eine Deletion von DauA (Abb. E46C) haben Veränderungen der zellulären Distribution von DcuS-YFP zur Folge. Der Vergleich mit DcuS-YFP(Wt) im DauA-wildtypischen Stamm JM109 (Abb. E46A) offenbart, dass die Fluoreszenzmaxima an den Polen sowie das schwächere laterale Leuchten in allen

Stämmen vorkommt und diese Beobachtungen mit den Studien von Scheu et al. (2008) übereinstimmen.

4.3.3.2 Lokalisierung der Transporter DctA-YFP und YFP(A206K)-DauA im DcuS bzw. DctA/DauA-negativen Hintergrund

DctA ist ein bifunktionales Protein, es fungiert sowohl als aerober Transporter von C₄-Dicarbonsäuren als auch als Regulator von DcuS (Witan et al. 2012a). Gemeinsam formen beide den DctA/DcuS-Sensorkomplex. Der Transporter DauA stellt eine weitere bifunktionale Komponente im aeroben C₄-Dicarbonsäure-Stoffwechsel dar. Zusätzlich zum Transport von C₄-Dicarboxylaten unter aziden Bedingungen (pH 5) wirkt sich DauA regulatorisch auf die Expression von DctA aus (Karinou et al. 2013). Bezüglich ihrer Lokalisierung unterscheiden sich die Transporter maßgeblich. Die funktionale Fusion DctA-YFP besitzt eine heterogene Verteilung in der Membran von *E. coli* (Witan 2012). YFP(A206K)-DauA hingegen kommt ähnlich wie DcuS-YFP in Clustern am Septum und den Zellpolen vor. Analog zu den Lokalisierungsstudien mit DcuS-YFP wurden die Folgen einer DcuS- bzw. DctA/DauA-Defizienz auf die zelluläre Verteilung von DctA-YFP und YFP(A206K)-DauA kontrolliert.

Die Fluoreszenzverteilungen der Fusionen DctA-YFP und YFP(A206K)-DauA in den Stämmen IMW480 (DcuS-) und EK3 (DctA- DauA-) sind in Abbildungen E47 und E48 aufgeführt. Der DcuS-Defekt sowie die DctA/DauA-Deletionen wirken sich nicht auf die Fluoreszenzverteilungen der Fusionen DctA-YFP und YFP(A206K)-DauA aus. Wie zuvor beschrieben (Witan 2012) kann DctA-YFP auch in den Stämmen IMW480 (DcuS-) und EK3 (DctA- DauA-) in ungleichmäßig-verteilten Fluoreszenzclustern in der Membran nachgewiesen werden (Abb. E47). Die Fusion YFP(A206K)-DauA liegt wie in 4.3.2 betrachtet, unabhängig vom genetischen Hintergrund der Stämme, in Fluoreszenzclustern an den Zellpolen und Septen vor (Abb. E48).

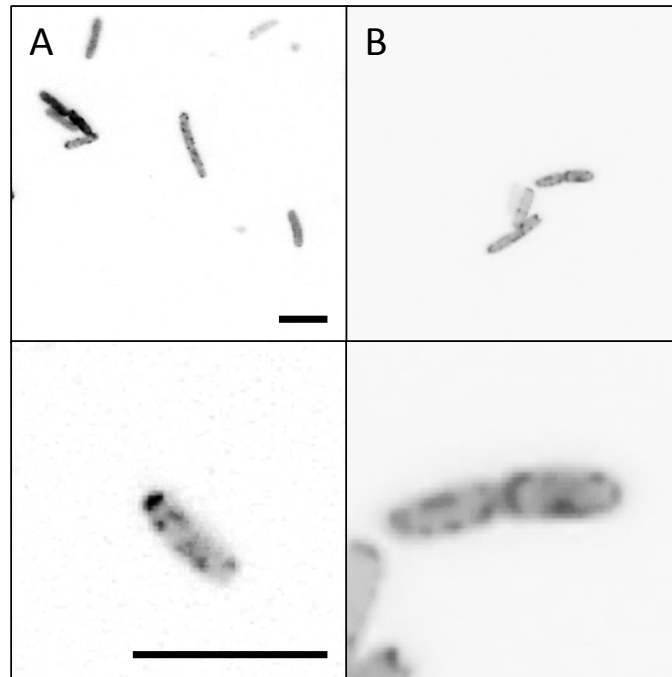


Abb. E47: Lokalisierung von DctA-YFP in einem DcuS-negativen Stamm (A) sowie im DctA/DauA-negativen Hintergrund (B). Das Plasmid pMW526 (DctA-YFP(Wt)) wurde in die Stämme IMW480 (DcuS-) und EK3 (DctA- DauA-) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,8 - 0,9. Anschließend wurden die Fusionen mit 133 μ M L-Arabinose für 3 Stunden (A) bzw. 333 μ M L-Arabinose für 1 Stunde (B) induziert. Die obere Bilderreihe zeigt Übersichtsansichten, die untere Nahaufnahmen. Die schwarzen Skalierungsbalken betragen 5 μ m. (A) DctA-YFP(Wt): pMW526 in IMW480 (DcuS-); (B) DctA-YFP(Wt): pMW526 in EK3 (DctA- DauA-)

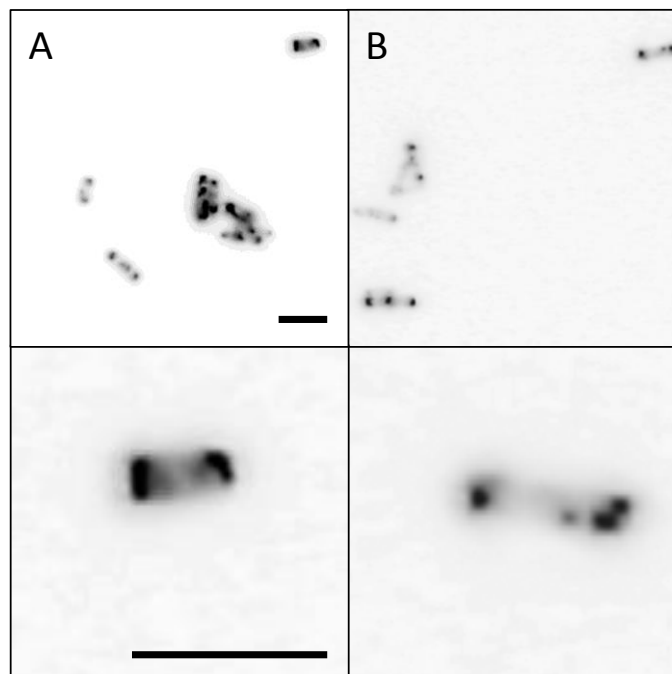


Abb. E48: Lokalisierung von YFP(A206K)-DauA in einem DctA/DauA-negativen Stamm (A) sowie im DcuS negativen Hintergrund (B). Das Plasmid pMW2013 (YFP(A206K)-DauA) wurde in die Stämme EK3 (DctA- DauA-) und IMW480 (DcuS-) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,8 - 0,9. Anschließend wurden die Fusionen mit 333 μ M L-Arabinose für 1 Stunden induziert. Die obere Bilderreihe zeigt Übersichtsansichten, die untere Nahaufnahmen. Die schwarzen Skalierungsbalken betragen 5 μ m. (A) YFP(A206K)-DauA: pMW2013 in EK3 (DctA- DauA-); (B) YFP(A206K)-DauA: pMW2013 in IMW480 (DcuS-)

4.3.4 Der Einfluss einer Koexpression von DcuS bzw. DctA auf die Lokalisierung von DctA-YFP, YFP-linker-YFP und YFP-DauA

Für die Sensorkinase DcuS konnten direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Antwortregulator DcuR sowie dem Koregulator DctA nachgewiesen werden (Janausch et al. 2004; Witan et al. 2012a). Dennoch weisen die funktionalen Fusionen YFP(A206K)-linker-DcuR und DctA-YFP eine völlig unterschiedliche zelluläre Distribution als DcuS-YFP auf. Der Transporter DauA, der sich regulatorisch auf die Expression von *dctA* auswirkt, hingegen zeigt eine ähnliche polare Anreicherung wie DcuS. Eine DcuS-Defizienz hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Lokalisierung der YFP-Fusionen von DctA und DauA. Die zellulären Gehalte von Sensorproteinen wie DcuS liegen wesentlich unter den Konzentrationen von metabolischen Enzymen und Transportern. Aufgrund dieser Tatsachen wurde der Einfluss der Koexpression von DcuS auf die zelluläre Verteilung der Fusionskonstrukte DctA-YFP, YFP(A206K)-linker-DcuR und YFP(A206K)-DauA in ergänzenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen überprüft. Für YFP(A206K)-DauA wurde darüber hinaus wegen der potentiellen Interaktion mit DctA, die Koexpression von DctA analysiert. Die Expression der YFP-Fusionen sowie von DcuS bzw. DctA erfolgte von pBAD30- bzw. pBAD18-Derivaten (Guzman et al. 1995). Das Expressionsniveau der Fusionskonstrukte und der Proteine kann in diesen Plasmiden sehr genau durch L-Arabinose reguliert werden.

Die Lokalisierung von DctA-YFP im DcuS-negativen Hintergrund ist zu Vergleichszwecken nochmals in Abbildung E49A dargestellt. Bei ähnlichen Expressionsniveaus von DcuS und DctA-YFP verändert sich jedoch die Fluoreszenzverteilung von heterogenen Flecken in der gesamten Membran zu polaren Clustern (Abb. E49B). Das Fluoreszenzmuster der Koexpression gleicht dem von DcuS-YFP. Die erhöhte DcuS-Proteinkonzentration führt offensichtlich dazu, dass die Mehrheit von DctA-YFP an den Zellpolen zu finden ist.

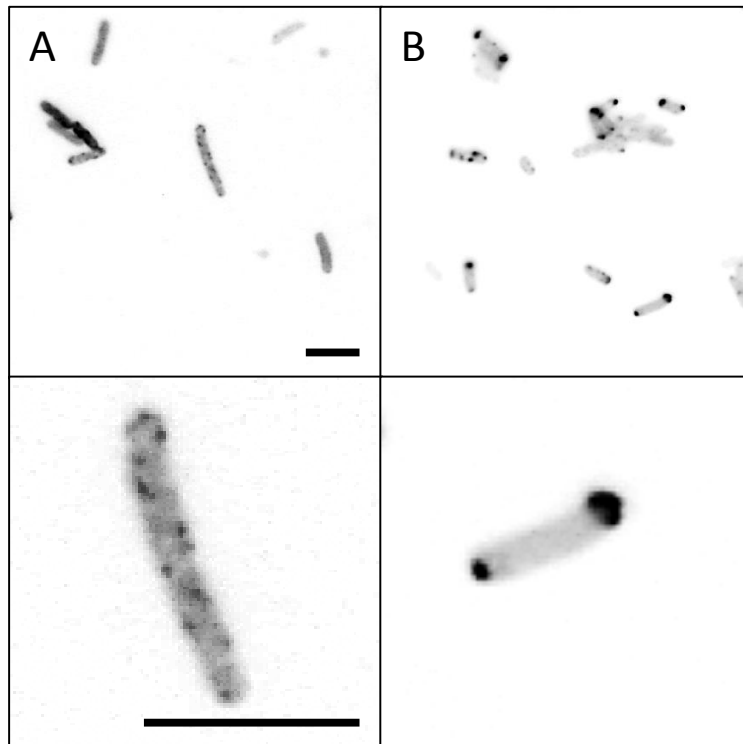


Abb. E49: Einfluss einer erhöhten His₆DcuS Produktion auf die Lokalisierung von DctA-YFP. Das Plasmid pMW526 (DctA-YFP(Wt)) wurde in Stamm IMW480 (DcuS-) transformiert (A) oder in Kombination mit Plasmid pMW1390(His₆-DcuS(Wt)) in Stamm IMW480 (DcuS-) transformiert (B). Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,9. Anschließend wurden die Fusionen mit 133 μM L-Arabinose für 3 Stunden induziert. Die obere Bilderreihe zeigt Übersichtsansichten, die untere Nahaufnahmen. Die schwarzen Skalierungsbalken betragen 5 μM. (A) DctA-YFP(Wt): pMW526 in IMW480 (DcuS-); (B) DctA-YFP(Wt): pMW526 & His₆-DcuS(Wt): pMW1390 in IMW480 (DcuS-)

Ähnlich fallen auch die Fluoreszenzmessungen mit YFP(A206K)-linker-DcuR aus. In Anwesenheit von wildtypischen DcuS-Mengen sind die YFP-Fusionen homogen im Cytoplasma der Zelle verteilt (Abb. E50A). Die Expression von DcuS in einem vergleichbaren Umfang wie die YFP-Fusion führt jedoch, wie zuvor bei DctA-YFP, zu einer polaren Anreicherung von YFP(A206K)-linker-DcuR (Abb. E50B). Demzufolge ist DcuS in der Lage seinen Antwortregulator in den cytoplasmatischen Polregionen der Zelle festzuhalten. Diese polare Lokalisierung von YFP(A206K)-linker-DcuR bei Koexpression von DcuS sowie die homogene Verteilung von YFP(A206K)-linker-DcuR in Gegenwart von wildtypischen DcuS-Mengen sind unabhängig vom Effektor Fumarat (siehe Abb. A28 im Anhang).

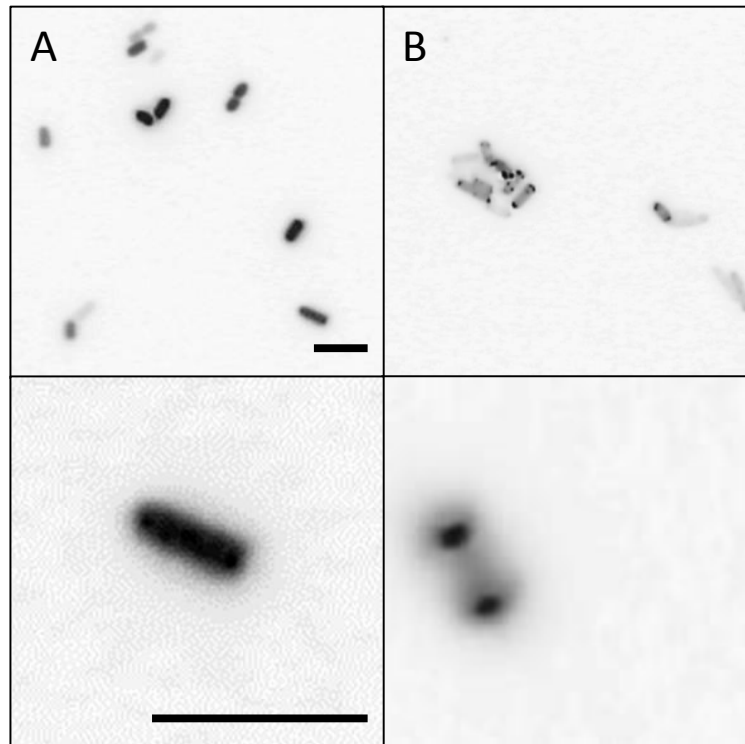


Abb. E50: Einfluss einer erhöhten His₆-DcuS Produktion auf die Lokalisierung von YFP(A206K)-linker-DcuR. Das Plasmid pMW1953 (YFP(A206K)-linker-DcuR) wurde in Stamm IMW238 (DcuR-) transformiert (A) oder in Kombination mit Plasmid pMW1390(His₆-DcuS(Wt)) in Stamm IMW238 (DcuR-) transformiert (B). Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 - 0,8. Anschließend wurden die Fusionen mit 333 μM L-Arabinose für 1 Stunde induziert. Die obere Bilderreihe zeigt Übersichtansichten, die untere Nahaufnahmen. Die schwarzen Skalierungsbalken betragen 5 μm. (A) YFP(A206K)-linker-DcuR: pMW1953 in IMW238 (DcuR-); (B) YFP(A206K)-linker-DcuR: pMW1953 & His₆-DcuS(Wt): pMW1390 in IMW238 (DcuR-)

Die Koexpression von DcuS und YFP(A206K)-DauA hat keine offenkundige Auswirkung auf die Fluoreszenzverteilung in der Zelle. Die polaren Cluster an den Septen und Zellpolen bleiben in Abwesenheit (Abb. E51A) sowie bei erhöhter Expression von DcuS (Abb. E51B) erhalten. Die polare Anreicherung von YFP(A206K)-DauA erfolgt also unabhängig vom DcuS-Gehalt der Zelle. Andererseits beeinflusst eine erhöhte Produktion des Transporters DctA sehr wohl die Lokalisierung von YFP(A206K)-DauA. Die Anreicherungen von YFP(A206K)-DauA an den Septen und Zellpolen im DctA-negativen Hintergrund (Abb. E51C) lösen sich bei vergleichbaren DctA- und YFP(A206K)-DauA-Proteingehalten zugunsten von heterogen verteilten Clustern in der gesamten Membran auf (Abb E51D). Das Fluoreszenzmuster der Zellen der Koexpression von DctA und YFP(A206K)-DauA entspricht der Verteilung von DctA-YFP in der Zelle. DctA ist folglich in der Lage, die Verteilung von YFP(A206K)-DauA in der Zelle zu verändern. Diese Ergebnisse befürworten die Annahme einer direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen DctA und DauA.

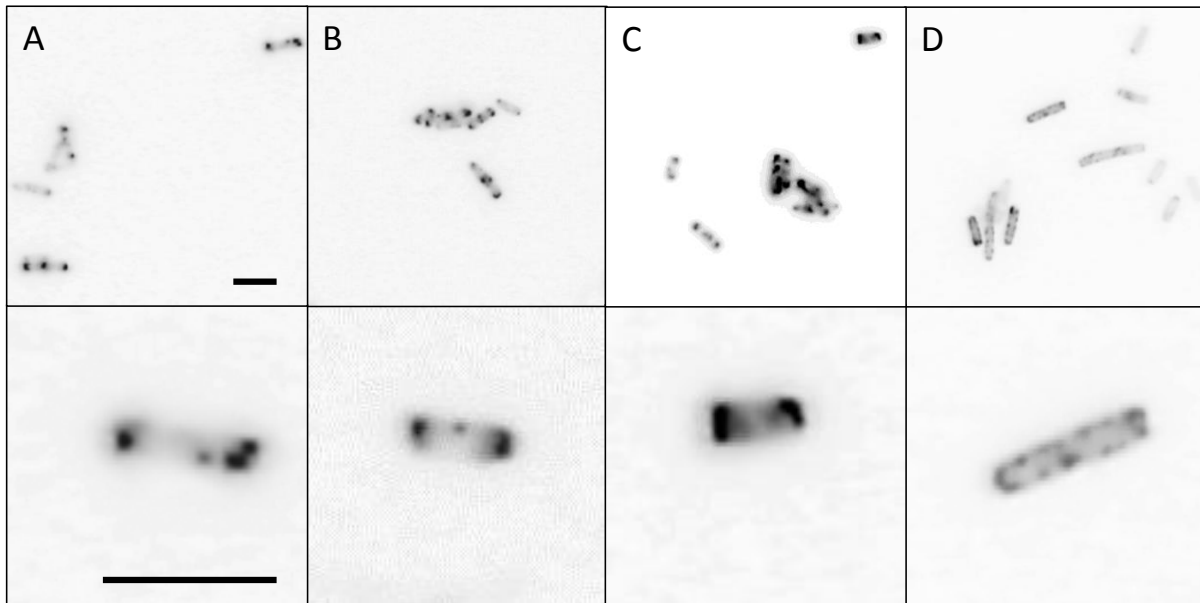


Abb. E51: Einfluss einer erhöhten His₆DcuS oder His₆-DctA-His₆ Produktion auf die Lokalisierung von YFP-DauA. Die *E. coli* Stämme IMW480 (DcuS-) und EK3 (DctA- DauA-) wurden mit dem Plasmid pMW2031 (YFP(A206K)-DauA) sowie den Expressionsplasmiden von His₆DcuS oder His₆-DctA-His₆ (siehe unten) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,8 - 0,9. Anschließend wurden die Fusionen mit 333 µM L-Arabinose für 1 Stunde induziert. Die obere Bilderreihe zeigt Übersichtansichten, die untere Nahaufnahmen. Die schwarzen Skalierungsbalken betragen 5 µM. (A) YFP(A206K)-DauA: pMW2031 in IMW480 (DcuS-); (B) YFP(A206K)-DauA: pMW2031 & His₆-DcuS(Wt): pMW1390 in IMW480 (DcuS-); (C) YFP(A206K)-DauA: pMW2031 in EK3 (DctA- DauA-); (D) YFP(A206K)-DauA: pMW2031 & His₆-DctA-His₆(Wt):pMW1194 in EK3 (DctA- DauA-)

5 Diskussion

5.1 Signaltransduktion im DctA/DcuS-Sensorkomplex von *Escherichia coli*

5.1.1 Die Struktur und der Transportmechanismus des DAACS-Transporters

Glt_{ph}

Der Aminosäuretransporter Glt aus *Pyrococcus horikoshii* (Glt_{ph}) und DctA aus *E. coli* (DctA_{Ec}) gehören zu der DAACS-Transporterfamilie. Die Struktur und der Transportmechanismus von Glt_{ph} wurden bereits ausführlich untersucht, und deshalb stellt dieser sekundäre Transporter ein wichtiges Modellprotein der DAACS-Familie dar. DctA aus *Escherichia coli* besitzt lediglich eine Sequenzidentität von 26 % mit Glt_{ph}. Im Bereich der Transportdomäne tritt bei DctA_{Ec} sowie bei anderen Glt_{ph}-Homologen jedoch ein viel höherer Konservierungsgrad auf. So sind im Fall von DctA_{Ec} von den transportrelevanten Aminosäuren der katalytischen Domäne 14 von 20 Positionen konserviert. Ungeachtet der geringen Sequenzidentität von DctA_{Ec} und Glt_{ph} weisen die beiden sekundären Transporter fast identische Topologien auf (Witan et al. 2012a). Lediglich die periplasmatische Helix 3b und die cytoplasmatische Helix 8b von DctA_{Ec} verfügen in Glt_{ph} über keinen Gegenpart. Angesichts der beachtlichen Gemeinsamkeiten in der Primärsequenz und Topologie der Transportdomäne bzw. des gesamten Proteins der beiden Transporter kann für DctA eine vergleichbare Struktur und ein ähnlicher Transportmechanismus angenommen werden. Mit der Kristallstruktur von Glt_{ph} (Boudker et al. 2007) als Grundlage konnte eine Strukturvorhersage für DctA durch den SWISS-MODEL Server (Arnold et al. 2006) erstellt werden.

Der Transporter Glt_{ph} katalysiert die Aufnahme von L-Aspartat im Symport mit 3 Na⁺-Ionen (Groeneveld & Slotboom 2010). Glt_{ph} besitzt acht Transmembranhelices (TM1-8) und zwei Haarnadelschleifen (HP1-2), die zu einer zylinderförmigen Struktur mit einer zentralen wasserhaltigen Aushöhlung angeordnet sind (Yernool et al. 2004). Dieser Symporter liegt als Homotrimer in der Membran vor, wobei jedes Protomer eine zentrale Trimerisierungsdomäne und eine periphere katalytische Domäne aufweist (Yernool et al. 2004; Boudker et al. 2007; Reyes et al. 2009). Die Substratbindetasche wird durch TM7, TM8 sowie HP1 und HP2 gebildet (Yernool et al. 2004). Dabei gehen sowohl die beiden TMs als auch die HPs über ihre Aminosäurereste Wechselwirkungen mit dem Substrat ein. Die symmetrischen Haarnadelschleifen HP1 und HP2 schirmen das gebundene Substrat vom umgebenden Medium ab und scheinen als cytoplasmatische bzw. periplasmatische

Schranken zu dienen (Boudker et al. 2007; Shrivastava et al. 2008; Reyes et al. 2009; DeChancie et al. 2011). Bei den Kristallstrukturanalysen wurden zwei Na^+ -Bindestellen (Na1 und Na2) mit Thallium identifiziert, von denen keine direkt mit L-Aspartat koordiniert ist (Boudker et al. 2007). Die Position der dritten Na^+ -Bindestelle mit direktem Kontakt zum Substrat L-Aspartat wird diskutiert (Verdon et al. 2014).

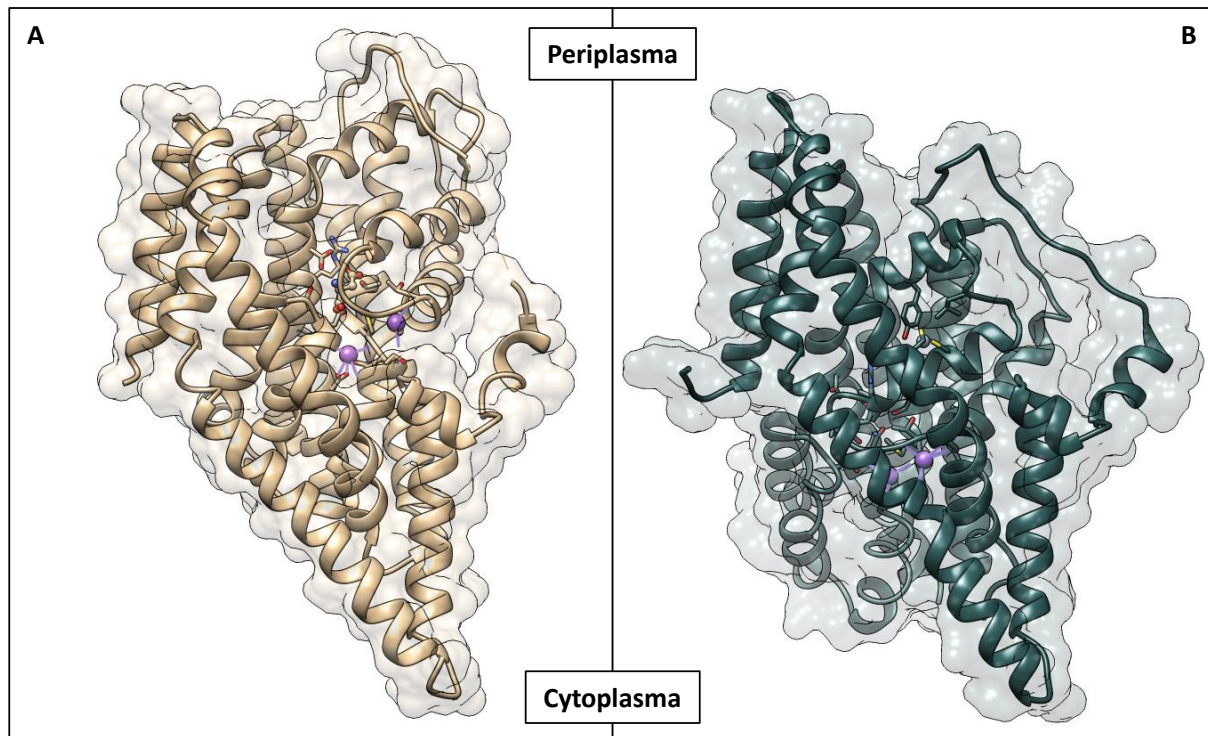


Abb. D1: 3D-Strukturen von Glt_{ph} in periplasmatischer (A) sowie in cytoplasmatischer Konformation (B). Die Kristallstrukturen von Glt_{ph} wurden mit dem Programm UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) bearbeitet und dargestellt. (A) Struktur des Glt_{ph} -Monomers in periplasmatischer Orientierung mit L-Aspartat sowie zwei Na^+ -Ionen gebunden (Boudker et al. 2007; PDB ID: 2NWX). (B) Cytoplasmatische Orientierung des Glt_{ph} -Monomers im Komplex mit zwei Na^+ -Ionen (Reyes et al. 2009; PDB ID: 3KBC).

Werden die Liganden L-Aspartat sowie Na^+ gebunden, kommt es zum Konformationswechsel der Transportdomäne von periplasmatischer zu cytoplasmatischer Orientierung (Reyes et al. 2009). Diese strukturellen Veränderungen sind mit einer Verschiebung der katalytischen Domäne von ungefähr 15 \AA über die Membran verbunden. Die Substratbindetasche liegt dann dem Cytoplasma zugewandt. Zusätzlich zur umfangreichen Starrkörperbewegung der katalytischen Transportdomäne zwischen der periplasmatischen und cytoplasmatischen Orientierung gehen lokale Konformationsänderungen dieser Domäne mit Bindung und Abgabe der Liganden einher (Verdon et al. 2014). In Abbildung D1 sind die Strukturen mit extrazellulärer und intrazellulärer Orientierung von Glt_{ph} einander gegenüber gestellt. Die Aspartatbindung sowie das Schließen der extrazellulären Schranke ist thermodynamisch an

die Assoziation von Na^+ -Ionen gekoppelt (Boudker et al. 2007). Für Glt_{ph} konnte neben der Kristallstruktur der L-Aspartat-gebundenen Form auch noch die Strukturen der Ligandenfreien Apoform sowie der ausschließlich Na^+ -gebundenen Form aufgelöst werden (Verdon et al. 2014). Der Vergleich dieser 3D-Strukturen deckt die Plastizität der Transportdomäne auf und zeigt Momentaufnahmen der Teilschritte des Transportvorgangs. Der Transportzyklus von Glt_{ph} nach dem Modell des alternierenden Zugangs (Jardetzky 1966) ist in Abbildung D2 zusammengefasst.

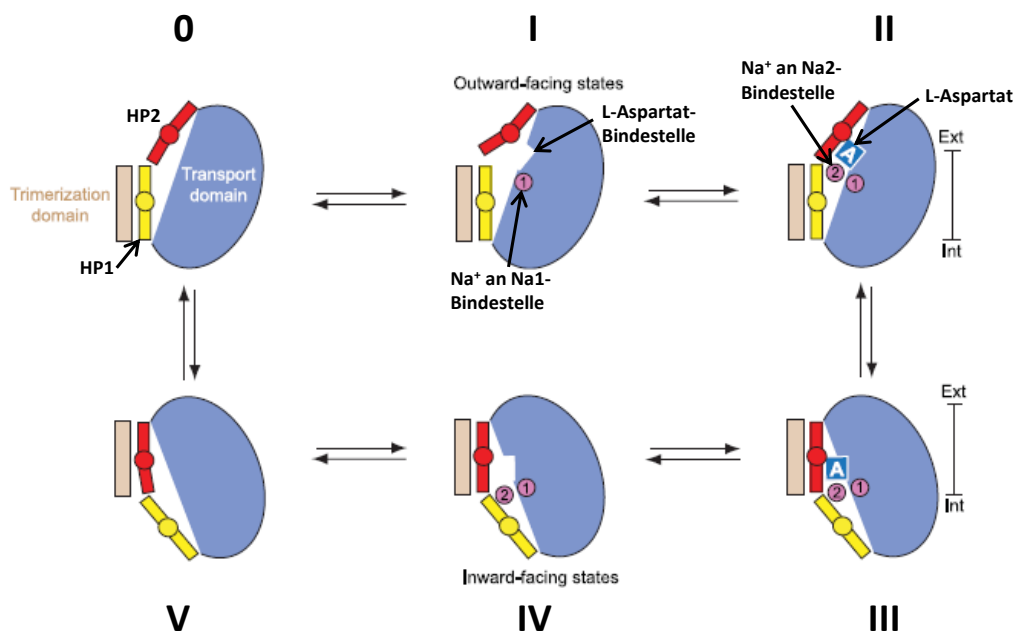


Abb. D2: Vorgeschlagener Transportzyklus von Glt_{ph} . Die Na^+ -Bindung an die Na1-Bindestelle der periplasmatischen (Outward-facing state) Apoform von Glt_{ph} (0) leitet die Isomerisierung zur gebundenen Konformation ein. Die Bindungsstellen für Na2 und L-Aspartat werden geformt und die Öffnung der Schranke HP2 verhindert die Translokation der Transportdomäne (I). Die Schließung von HP2 ist an die Anlagerung von L-Aspartat sowie eines weiteren Na^+ -Ions gekoppelt (II) und erlaubt die anschließende Translokation in die cytoplasmatische Konformation (Inward-facing state) (III). Der Mechanismus der Abgabe der Substrate über die Schranken HP1 und HP2 ist noch unklar (IV). Nach Abgabe der Liganden befindet sich Glt_{ph} in der kompakten cytoplasmatischen Apoform (V) und kehrt anschließend wieder in die periplasmatische Apoform zurück (0). (geändert nach Verdon et al. 2014)

5.1.2 Funktionsmutanten von DctA

DctA wirkt neben seiner Tätigkeit als Transporter regulierend auf das DcuSR-System. Zur Aufklärung einer potentiellen sensorischen Funktion von DctA als Kosensor von DcuS im DctA/DcuS-Sensorkomplex wurde versucht die regulatorische von der katalytischen Funktion des Transporters durch zufällige und gerichtete Substitutionen zu entkoppeln. Mit der ungerichteten Mutagenese konnten allerdings keine monofunktionalen DctA-Mutanten

bestimmt werden. Das Screeningsystem erwies sich als ungeeignet zur Bestimmung der gewünschten Regulations- bzw. Transportvarianten von DctA.

In Tabelle D1 sind die Ergebnisse der Funktionsanalysen der gerichteten Substitutionen an den Positionen N301, S380, R383 und L414 zusammengefasst.

Tab. D1: Zusammenfassung der Funktionsanalysen einer Auswahl von DctA-Varianten. Die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Funktionsuntersuchungen aus 4.1.1.3-4.1.1.5 sowie der Interaktionsmessungen 4.1.1.7 sind angegeben.

DctA-Variante	<i>dcuB-lacZ</i> [MU]			Wachstum mit Fumarat [OD _{570nm} nach 11 h]	Aufnahme von [2,3- ¹⁴ C]-Fumarat [%]	BACTH-Interaktion [MU]	
	ohne Fumarat	mit Fumarat	Induktionsfaktor ^a			T18-DctA / T25-DcuS(Wt)	T18-DcuS(Wt) / T25-DctA
DctA-(DcuB-)	600 ± 60 ^b	513 ± 107 ^b	0,9 ^b	0,16 ± 0,05	5,3 ± 2,9	120 ± 16 ^c	133 ± 10 ^c
DctA(Wt)	119 ± 33	429 ± 71	3,6	1,34 ± 0,37	100 ± 11,2	205 ± 15	253 ± 51
DctA(N301A)	415 ± 77	408 ± 52	1,0	0,05 ± 0,01	9,1 ± 3,3	146 ± 15	144 ± 10
DctA(S380A)	185 ± 42	408 ± 56	2,2	0,90 ± 0,04	71,3 ± 16,6	226 ± 40	230 ± 60
DctA(S380D)	161 ± 49	418 ± 57	2,6	0,12 ± 0,05	12,0 ± 2,7	336 ± 36	259 ± 45
DctA(S380I)	299 ± 63	402 ± 70	1,3	0,07 ± 0,04	8,8 ± 5,8	309 ± 43	281 ± 36
DctA(S380N)	196 ± 52	245 ± 34	1,2	1,69 ± 0,02	9,4 ± 5,8	n.b.	n.b.
DctA(S380Q)	243 ± 33	395 ± 52	1,6	1,10 ± 0,07	7,8 ± 3,7	n.b.	n.b.
DctA(R383N)	182 ± 43	347 ± 54	1,9	1,10 ± 0,09	12,7 ± 0,8	n.b.	n.b.
DctA(L414A)	259 ± 53	369 ± 43	1,4	0,20 ± 0,01	13,6 ± 6,2	n.b.	n.b.

^a Induktionsfaktor: Quotient der Expressionsmessungen von *dcuB-lacZ* mit und ohne Fumarat.

^b Die Expressionsmessungen wurden unter anaeroben Bedingungen im DcuB-defizienten Stamm IMW503 durchgeführt.

^c Interaktionsmessungen der Negativkontrollen T18-DctA(Wt)/T25-*zip*(Wt) und T18-*zip*(Wt)/T25-DctA(Wt).

n.b.: nicht bestimmt

In und um die Substratbindetasche von DctA wurden insgesamt 45 gerichtete Aminosäureaustausche der transportrelevanten Aminosäuren sowie deren Umgebung erstellt. Dabei weisen 25 dieser DctA-Varianten eine Störung beider Funktionen auf. Im Vergleich dazu konnte in der cytoplasmatischen Helix 8b, die Gl_{T_{ph}} nicht besitzt, außer DctA(L414A) lediglich 14 wildtypische DctA-Varianten identifiziert werden. Dadurch wird die Bedeutung von Position L414 in Helix 8b für DctA hervorgehoben (Abb D3). Der Aminosäureaustausch L414A ruft bereits folgenschwere Defekte der regulatorischen Eigenschaft von DctA im DctA/DcuS-Komplex sowie der Aufnahmeaktivität von Fumarat hervor. Außerdem ist die Interaktion mit DcuS in dieser DctA-Variante reduziert (Witan et al.

2012a). Die Relevanz dieser cytoplasmatischen Helix für die Interaktion mit DcuS und demnach auch die regulatorische Eigenschaft von DctA wurde bereits ausführlich diskutiert (Witan et al. 2012a; Witan et al. 2012b).

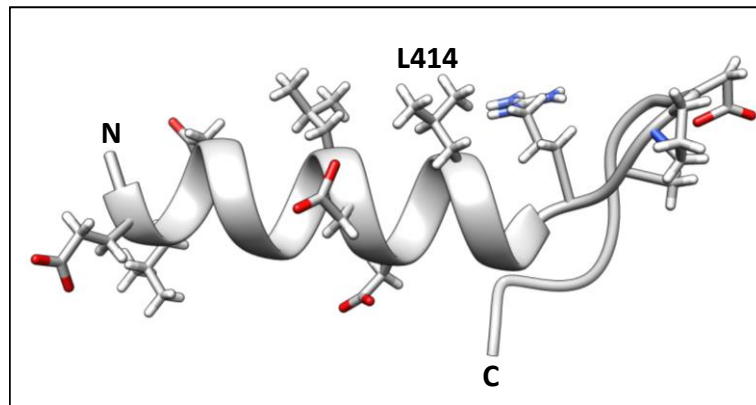


Abb. D3: Strukturmodell der cytoplasmatischen Helix 8b von DctA. Das Strukturmodell der cytoplasmatischen Helix 8b wurde vom *ab initio* Proteinstrukturvorhersage Server QUARK ONLINE (Xu & Zhang 2012) modelliert. Die 3D-Struktur wurde mit UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) bearbeitet und visualisiert. Die Aminosäurereste, die durch gerichtete Mutagenese substituiert wurden, sind im Modell dargestellt. Die Position von L414 ist angegeben.

Aminosäurereste S380 und R383 liegen auf der polaren Seite der amphipathischen Transmembranhelix 8 mit direktem Zugang zum Substrat L-Aspartat (Abb. D4A). Die Homologenreste D394 und R397 aus Glt_{Ph} sind in Aspartat- und Glutamattransportern der DAACS-Familie konserviert und spielen eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung und Substratspezifität (Yernool et al. 2004; Boudker et al. 2007). Demnach soll $\text{D394}_{\text{Glt}_{Ph}}$ mit der Aminogruppe und $\text{R387}_{\text{Glt}_{Ph}}$ mit der γ -Carboxylgruppe von L-Aspartat wechselwirken. Im Glutamattransporter EAAC1 aus *Oryctolagus cuniculus* fungiert die geladene Seitenkette des S380-homologen Aminosäurerestes D444 als molekulare Barriere für die Bindung bzw. den Transport von Succinat (Teichmann & Kanner 2007). Die Substitution von $\text{D444}_{\text{EAAC1}}$ mit kleinen Resten wie Alanin oder Serin gestattet die Bindung von Succinat. Die Succinat- sowie die Aminosäureaufnahme dieser Mutanten ist jedoch gestört. Mutationen des Aminosäurerestes S380, der in den homologen Dicarboxylat-Transportern der DAACS-Familie konserviert ist, haben je nach Austausch unterschiedliche Auswirkungen auf die regulatorische und katalytische Funktion von DctA. Analog zum Transporter EAAC1 ermöglichen kleine neutrale oder polare Aminosäuren wie Alanin und Serin an Position 380 von DctA (Abb. D4A-B) die Bindung und den Transport von C_4 -Dicarbonsäuren. Darüber hinaus wirken diese DctA-Varianten regulatorisch auf das DcuSR-System. Substitutionen mit

den Aminosäuren Aspartat, Isoleucin, Asparagin und Glutamin (Abb. D4C-F) hingegen inhibieren die Fumarataufnahme. Dabei scheint die Länge der Seitengruppe und nicht deren Ladung der maßgebende Faktor für die Beeinträchtigung der Bindung bzw. des Transportvorgangs zu sein. Der Rest S380 von DctA bzw. die Aspartatreste der homologen Aminosäuretransporter spielen demnach eine beträchtliche Rolle bei der Substratbindung und sind vermutlich für die Unterschiede in den Substratspektren von Dicarboxylat- und Aminosäuretransportern verantwortlich. Zudem stören diese Mutationen mit Ausnahme von S380D die regulatorische Funktion von DctA. Der Verlust der regulatorischen Eigenschaft geht jedoch nicht zwangsläufig mit einer gestörten Wechselwirkung mit DcuS, wie für DctA(L414A) beschrieben (Witan et al. 2012a), einher. Bei Variante DctA(S380D) konnten katalytische und regulatorische Funktion entkoppelt werden. Diese monofunktionale Variante von DctA wirkt noch regulierend auf DcuSR, sie ist jedoch nicht mehr in der Lage den Transport von Fumarat zu katalysieren. Folglich ist die regulatorische Eigenschaft von DctA unabhängig vom Transport. Auch bei Variante DctA(R383N) (Abb. D4G) ist die regulatorische Funktion im Großen und Ganzen intakt und das Wachstum mit Fumarat erfolgt wildtypisch. Lediglich der Transport dieser Variante ist beeinträchtigt. Für die Varianten DctA(S380N) und DctA(S380Q) treten ebenso gegensätzliche Ergebnisse für die Wachstums- und Transportmessungen auf und können wohlmöglich mit reduzierter Affinität dieser Varianten für Fumarat erklärt werden. In Glt_{ph} wurde durch die Mutation R397A ebenfalls die Affinität des Transporters für L-Aspartat erheblich herabgesetzt und ermöglichte damit die Strukturaufklärung der ausschließlich mit Na^+ -gebundenen Form von Glt_{ph} (Verdon et al. 2014).

Aminosäure N301 kommt im entwundenen Abschnitt von TM7 vor und weist mit der Seitenkette von der Substratbindetasche weg (Abb. D5A). In Glt_{ph} ist der homologe Rest N310 Teil des NMD-Motivs, welches in Aminosäuretransportern der DAACS-Familie konserviert ist, und interagiert vermutlich mit D312 (Yernool et al. 2004). Diese Wechselwirkung stabilisiert voraussichtlich die Struktur der Bindetasche. Zusätzlich soll N310 _{Glt_{ph}} Bestandteil der Na^+ -Bindestelle Na1 sowie der vermeintlichen Na^+ -Bindestelle Na3 sein (Boudker et al. 2007; Huang & Tajkhorshid 2010; Bastug et al. 2012). Die Mutation N301A (Abb. D5B) hat gravierende Auswirkungen auf DctA. Neben den Defekten der regulatorischen und katalytischen Funktionen des Transporters, ist ebenso dessen Wechselwirkung mit DcuS gestört. Diese Effekte könnten das Resultat starker struktureller

Veränderungen sein, die eventuell durch einen Verlust der Wasserstoffbrückenbindung der Reste von N301 und D303 hervorgerufen werden. Diese Destabilisierung der Bindetasche könnte die strukturelle Integrität des gesamten Transporters stören.

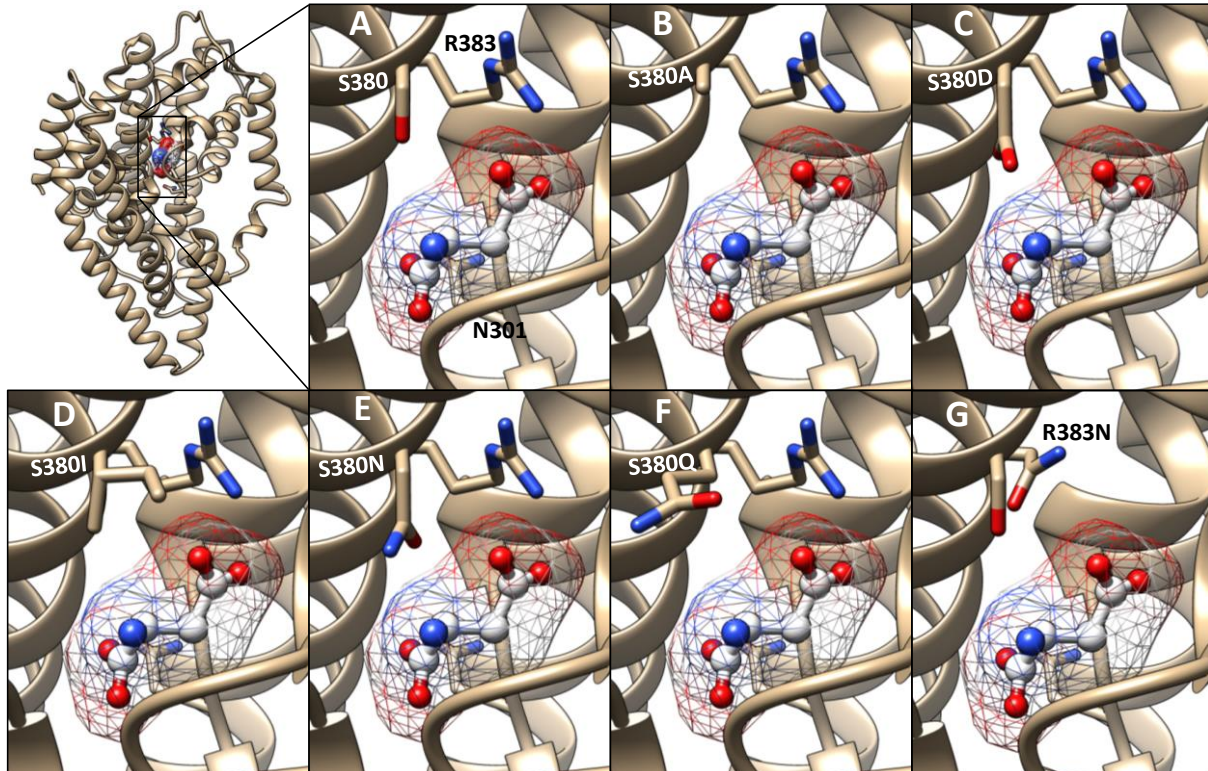


Abb. D4: Strukturmodelle der DctA-Varianten an Positionen S380 und R383. Die 3D-Modelle der DctA-Varianten wurden auf Grundlage der DctA-Strukturvorhersage aus 4.1.1.2 vom SWISS-MODEL Server (Arnold et al. 2006) berechnet und mit dem Programm UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) bearbeitet und visualisiert. Die Aminosäurereste der Positionen 301, 380 und 383 sind dargestellt. Das Substrat L-Aspartat wurde durch Strukturvergleiche mit der Glt_{ph} -Kristallstruktur mit gebundenem L-Aspartat (Boudker et al. 2007; PDB ID: 2NWX) in die Modelle der jeweiligen Varianten eingefügt. (A) DctA(Wt); (B) DctA(S380A); (C) DctA(S380D); (D) DctA(S380I); (E) DctA(S380N); (F) DctA(S380Q); (G) DctA(R383N)

Die Mehrheit der erstellten DctA-Varianten demonstriert, dass die regulatorische und die katalytische Funktion des Transporters strukturell eng miteinander verknüpft sind. Dennoch konnte wie zuvor bereits beim anaeroben Antiporter DcuB eine Transport-defiziente Variante identifiziert werden. Die monofunktionale Regulationsvariante DctA(S380D) zusammen mit den von Kleefeld et al. (2009) beschriebenen Varianten DcuB(E79A) und DcuB(R84A) beweisen, dass die katalytische und regulatorische Eigenschaften der beiden Transporter nicht untrennbar gekoppelt sind. Die Existenz dieser Varianten bestätigt, dass die Transportfunktion bzw. der Transportvorgang von DctA und DcuB nicht für die Regulation des DcuSR-Systems erforderlich ist. Deshalb kann die Rolle von DctA als ein

metabolischer Fluxsensor im DctA/DcuS-Sensorkomplex ausgeschlossen werden. Monofunktionale Transportvarianten wie DcuB(T394I) und DcuB(D398N) (Kleefeld et al. 2009) konnten allerdings für DctA nicht bestimmt werden.

Darüber hinaus bestätigen die Funktionsanalysen der Glt_{ph} -homologen Aminosäurereste der Bindetasche die katalytischen und strukturellen Gemeinsamkeiten der Transporter Glt_{ph} und DctA. Bei den Aminosäureaustauschen an den 6 nicht konservierten Positionen der Substratbindetasche zu den Glt_{ph} -homologen Aminosäureresten traten lediglich bei DctA(S276R) und DctA(R377A) Störungen beider Funktionen auf. Die Ergebnisse untermauern das Strukturmodell von DctA auf Grundlage von Glt_{ph} und unterstützten die Annahme eines vergleichbaren Transportmechanismus für DctA.

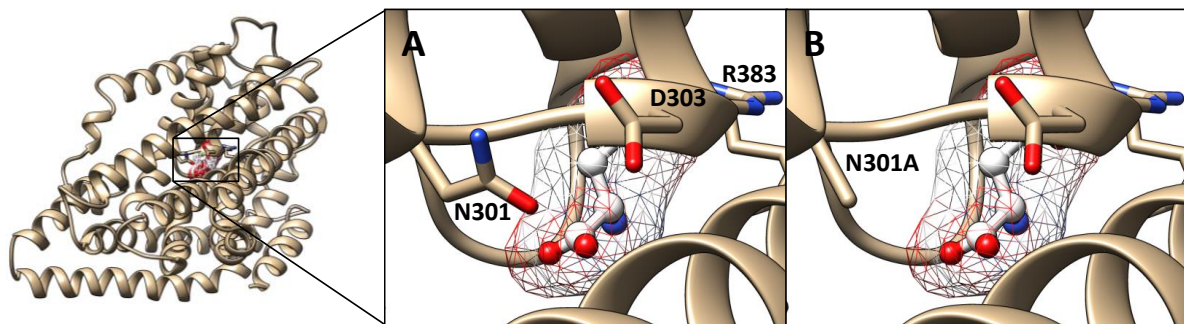


Abb. D5: Strukturmodell der Variante DctA(N301A). Das 3D-Modell der Variante DctA(N301A) wurde auf Grundlage der DctA-Strukturvorhersage aus 4.1.1.2 vom SWISS-MODEL Server (Arnold et al. 2006) berechnet und mit dem Programm UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) bearbeitet und visualisiert. Die Sicht auf die Substratbindetasche mit dem Substrat L-Aspartat erfolgt vom Cytoplasma. Die Aminosäurereste der Positionen 301, 303 und 383 sind dargestellt. Das Substrat L-Aspartat wurde durch Strukturvergleiche mit der Glt_{ph} -Kristallstruktur mit gebundenem L-Aspartat (Boudker et al. 2007; PDB ID: 2NWX) in die Modelle der jeweiligen Varianten eingefügt. (A) DctA(Wt); (B) DctA(N301A)

5.1.3 Die Signaleingangsstelle des DctA/DcuS-Sensorkomplexes

Um die Verwendung der Bindestellen für C_4 -Dicarbonsäuren bei der Signalerkennung im DctA/DcuS-Sensorkomplex aufzuklären, wurden die Induktion von *dcuB-lacZ* durch DcuSR und die Inhibition der Aufnahmekapazität von Succinat durch DctA für eine Auswahl von Substraten getestet und verglichen. Neben den bereits bekannten Transportsubstraten von DctA L-Malat, L-Aspartat, Fumarat und Succinat wurden die Substanzen Citrat, Maleinat und Nitropropionat untersucht. Die Gegenüberstellung der Expressions- und Transportmessungen (Abb. D6) zeigt, dass alle verwendeten Substrate eine Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ* um mindestens den Faktor 2 bewirken. Dabei dienten L-Malat, L-Aspartat, Fumarat und Citrat als besonders gute Effektoren (Faktor 3 - 4). Die

Sensordomäne PAS_p von DcuS erkennt Substrate wie Maleinat, Malat, Fumarat, Succinat, und Aspartat, bei denen die Carboxylgruppen 3,1 – 3,8 Å voneinander entfernt liegen (Kneuper et al. 2005). Die Bindung der Tricarbonsäure Citrat hingegen stellt eine Ausnahme dar. Sie erfolgt analog zu den C₄-Dicarbonsäuren mit zwei benachbarten Carboxylgruppen des Citrats (Krämer et al. 2007). Der Austausch einer der Carboxylgruppen durch eine Nitrogruppe, wie im Fall von Nitropropionat, sowie kleine polare Substituenten an der C2 und C3 Position der Dicarboxylate, wie Hydroxyl-, Thiol- und Aminogruppen, werden im Gegensatz zu größeren unpolaren Seitenketten wie Methylresten von der Sensordomäne toleriert (Kneuper et al. 2005).

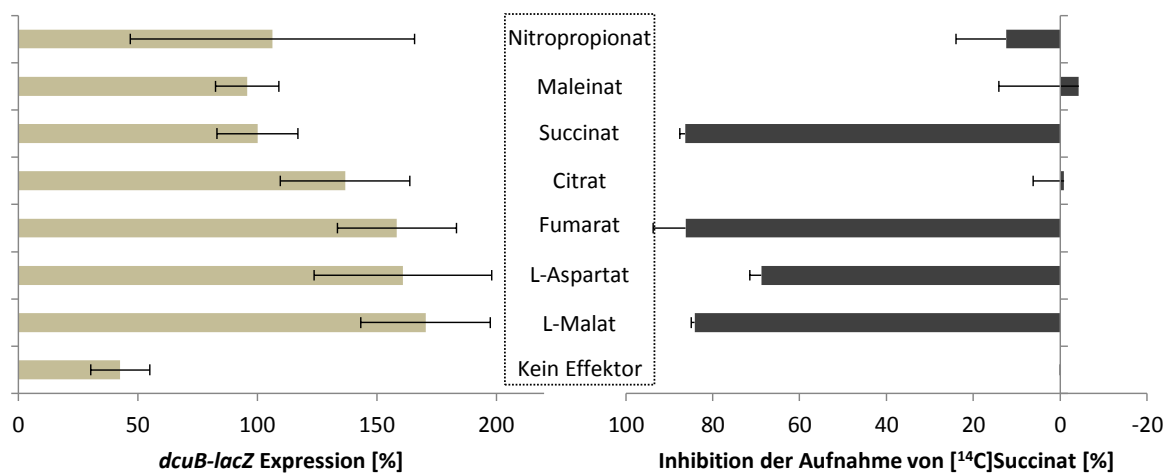


Abb. D6: Vergleich der Substratspektren von DcuS und DctA. Links: Substratspektrum von DcuS gemessen durch die Induktion von *dcuB-lacZ* durch die Effektoren (4.1.2.1). Rechts: Substratspektrum von DctA gemessen anhand der Inhibition der Aufnahme von radioaktiv-markiertem Succinat durch die Kompetitoren (4.1.2.2).

Die Mindestvoraussetzung an Substrate von DctA sind eine C₄-Kette sowie zwei freie Carboxylgruppen (Kay & Kornberg 1971). Der Transport von [¹⁴C]-Succinat konnte deshalb durch L-Malat, L-Aspartat, Fumarat und Succinat kompetitiv gehemmt werden. Maleinat und Nitropropionat hatten erst ab Konzentrationen von 5 mM eine starke Inhibition der Aufnahme von radioaktiv-markiertem Succinat zur Folge (4.1.2.3: Abb. E15). Sie besitzen demnach eine geringere Affinität zur Bindestelle von DctA als Succinat. Ob die beobachteten Inhibitionen des Transports durch die Aufnahme der Kompetitoren oder durch die Blockade der Bindetasche hervorgerufen werden ist unklar. Citrat hingegen hatte auch bei Konzentrationen von 20 mM keine nennenswerten Auswirkungen auf den Succinattransport. Verbindungen mit kürzeren oder längeren Kohlenstoffketten als C₄ wie Malonat, L-Glutamat und α-Oxoglutarat haben ebenfalls keine Auswirkung auf die C₄-Dicarbonsäure-Aufnahme

(Kay & Kornberg 1971). Mit Citrat konnte somit ein starker Effektor des DcuSR-Systems identifiziert werden, der nicht an DctA bindet und transportiert wird. Demzufolge ist die Sensor kinase DcuS für die Signalerkennung im DctA/DcuS-Sensorkomplex verantwortlich und die Bindestelle von DctA spielt somit keine Rolle als Signaleingangsstelle. DctA überträgt demnach auch kein Signal an DcuS nach Bindung oder Transport der C₄-Dicarbonsäuren. Diese Vorstellungen stehen im Einklang zu den Untersuchungen an der Sensordomäne PAS_p von DcuS, bei denen durch Substitutionen das Effektorenspektrum verändert wurde (Krämer et al. 2007; Wörner 2013).

Für den anaeroben Antiporter DcuB konnten zusätzlich zu Citrat die Substanzen Maleinat und Nitropropionat als nicht transportierbare Effektoren von DcuSR identifiziert werden (Wörner 2013). Die beobachteten Unterschiede in den Substratspektren von DcuS und dem anaeroben Koregulator DcuB sind weitere Anhaltspunkte für die Signalerkennung durch die Histidinkinase DcuS.

Die Strukturen der beiden Bindestellen für C₄-Dicarbonsäuren des DctA/DcuS-Sensorkomplexes sind in Abbildung D7AB gegenübergestellt. Die Bindung von Dicarboxylaten und weiteren Substraten in PAS_p von DcuS sowie die Struktur der Sensordomäne wurde bereits ausführlich untersucht (Zientz et al. 1998; Pappalardo et al. 2003; Bock 2004; Kneuper et al. 2005; Krämer et al. 2007; Cheung & Hendrickson 2008; Wörner 2013). Die Aminosäurereste R107, H110, F120, K121, G140, F141, R147 und F149 sind an der Effektorbindung beteiligt (Abb. D7A) (Kneuper et al. 2005; Cheung & Hendrickson 2008). Die Glt_{ph}-homologen, transportrelevanten Aminosäurereste von DctA sind in der Strukturvorhersage der Bindetasche von DctA abgebildet (Abb. D7B). Obwohl DcuS und DctA ähnliche Substratspektren besitzen, unterscheiden sich ihre Bindetaschen im Aufbau und der Struktur erheblich. PAS_p setzt sich aus einem zentralen, antiparallelen, fünf-strängigen β -Faltblatt sowie flankierenden α -Helices zusammen. Diese Struktur ermöglicht die Bindung von etlichen C₄-Verbindungen sowie der C₆-Tricarbonsäure Citrat. Wohingegen DctA, dessen Bindetasche aus Transmembranhelices TM7 und TM8 sowie HP1 und HP2 geformt wird, lediglich Substanzen mit C₄-Ketten und zwei freien Carboxylgruppen transportiert.

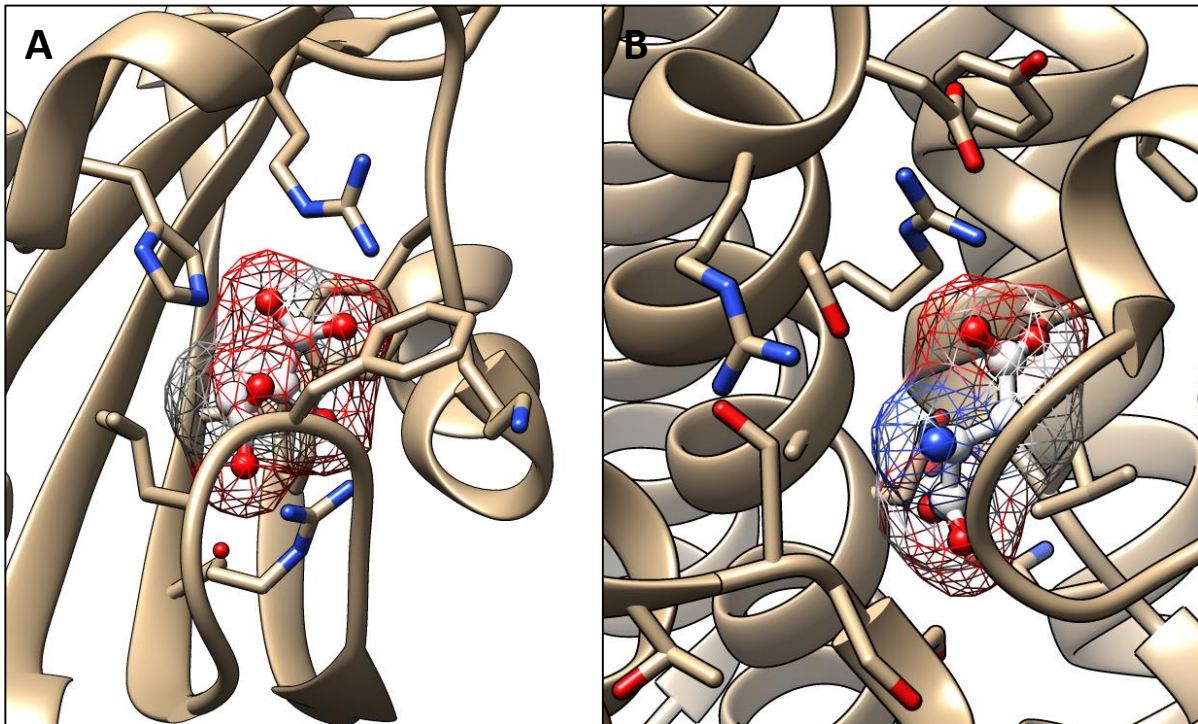


Abb. D7: Struktur und Strukturmodell der Bindestellen für C₄-Dicarbonsäuren in DcuS (A) und DctA (B). Die 3D-Strukturen wurden mit dem Programm UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) bearbeitet und visualisiert. (A) Kristallstruktur der periplasmatischen Sensordomäne PAS_p von DcuS mit gebundenem Malat (Cheung & Hendrickson 2008; PDB ID: 3BY8). Die an der Effektorbindung beteiligten Aminosäuren sind dargestellt. (B) Strukturmodell der Bindetasche von DctA wurde auf der Grundlage der Kristallstruktur des Transporters Glt_{ph} (Boudker et al. 2007; PDB ID: 2NWX) vom SWISS-MODEL Server (Arnold et al. 2006) vorhergesagt. Die Glt_{ph}-homologen, transportrelevanten Aminosäurereste von DctA sind hervorgehoben. Das Substrat L-Aspartat wurde durch Strukturvergleich mit der Glt_{ph}-Kristallstruktur in das Modell von DctA eingefügt.

5.1.4 Titration von DctA als Koregulator von DcuS

Die Titration der Funktion von DcuS mit zunehmenden Gehalten an DctA (4.1.3) und die DctA-Deletionsexperimente (Witan et al. 2012a) demonstrieren, dass die Anwesenheit des Transporters DctA bzw. die zellulären DctA-Mengen essentiell für den funktionsbereiten Zustand des Sensors DcuS sind. Die maximale Induktion der DcuSR-regulierten Zielgene hingegen ist unabhängig von den DctA-Mengen und nur an die Effektorkonzentration gebunden. Diese Beobachtungen unterstützen die Feststellung, dass die Transportaktivität nicht für die regulatorische Eigenschaft des Transporters DctA benötigt wird. Als weiteres Argument können zudem die K_m -Werte für den Transport von Fumarat durch DctA und die Induktion von *dcuB-lacZ* herangezogen werden. Die K_m -Werte für den Transport von C₄-Dicarbonsäuren durch DctA betragen 30 bis 50 μ M (Kay & Kornberg 1971; Janausch et al. 2002a). Demzufolge ist bei Fumaratkonzentrationen von 300 bis 500 μ M, bei denen in den DctA-Titrationsexperimenten die Expression von *dcuB-lacZ* noch nicht das halbmaximale Niveau erreicht, der Transporter DctA bereits vollständig gesättigt. Die Induktion des DcuSR-

Systems und der Transport erfolgen also bei sehr unterschiedlichen Substratkonzentrationen.

5.1.5 DctA als Koregulator vom DcuSR-Zweikomponentensystem

Sensorsysteme benötigen häufig Hilfsproteine um ihre sensorische Funktion zu erfüllen (Tetsch & Jung 2009; Buelow & Raivio 2010). Für einige membrangebundene Sensorkinasen konnten bifunktionale Transporter identifiziert werden, die regulatorisch auf deren Signaltransduktion wirken. So übernehmen Transporter teilweise die Detektion der Stimuli als Kosensoren. Der Lysin/pH-Sensor CadC aus *E. coli* nimmt Lysin indirekt über den Lysintransporter LysP wahr (Tetsch et al. 2008; Rauschmeier et al. 2014). Nach dem Modell von Rauschmeier et al. (2014) inhibiert LysP in Abwesenheit von Lysin den Sensor CadC. Die Bindung oder der Transport von Lysin durch LysP löst eine Konformationsänderung aus, die den Stimulus auf CadC überträgt und die Wechselwirkung zwischen den beiden verändert, ohne sie komplett aufzuheben. In diesem Zustand ist CadC empfänglich für die Aktivierung durch niedrigen pH und induziert die Expression seiner Zielgene *cadAB*. Ebenso ist die Wahrnehmung von extrazellulären Peptidantibiotika wie Bacitracin in *Bacillus subtilis* abhängig von dem ABC-Transporter BceAB. Der Histidinkinase BceS dieses Antibiotika-Resistenzmoduls fehlt eine periplasmatische Sensordomäne und sie ist demnach nicht in der Lage direkt auf die Antibiotika zu reagieren (Rietkötter et al. 2008). BceAB bindet offenbar Bacitracin und transferiert das Signal mittels einer direkten Protein-Protein-Interaktion auf BceS (Bernard et al. 2007; Gebhard & Mascher 2011; Kallenberg et al. 2013). Anhand von Punktmutationen im C-terminalen Bereich des Transporters konnte gezeigt werden, dass die Signalerkennung und Resistenzeigenschaft von BceAB funktionell eng verbunden sind, diese jedoch keine streng gekoppelten Prozesse darstellen (Kallenberg et al. 2013). Beim UhpAB-Zweikomponentensystem aus *E. coli* wirkt UhpC als Kosensor (Island & Kadner 1993). UhpC wird konstitutiv in geringen Mengen exprimiert und ist ein homologes Protein des Transporters UhpT. Die Transportaktivität von UhpC für Glucose-6-Phosphat ist jedoch sehr gering und wird für die Funktion als Kosensor nicht benötigt (Schwöppe et al. 2003). Das UhpABC-System induziert die Expression von *uhpT*, das die Aufnahme phosphorylierter Zuckern wie Glucose-6-Phosphat katalysiert (Weston & Kandner 1987). Die Funktion der Sensorkinase UhpB, die keine Sensordomäne besitzt, wird durch UhpC, welches eine starke

Affinität zu Glucose-6-Phosphat besitzt, kontrolliert. Nach Bindung von Glucose-6-Phosphat interagiert UhpC vermutlich mit UhpB und stimuliert so die Phosphorylierung der Sensorkinase (Island & Kadner 1993; Kadner et al. 1994; Schwöppe et al. 2003).

Im DctA/DcuS-Sensorkomplex hingegen liegt der Transporter DctA als Koregulator und nicht als Kosensor vor. In dieser Arbeit konnte im Gegensatz zu den Annahmen von Witan et al. (2012a; 2012b) demonstriert werden, dass DctA im DctA/DcuS-Sensorkomplex weder als Signaleingangsstelle noch als metabolischer Fluxsensor agiert. Stattdessen besitzt DcuS eine integrierte Sicherungsfunktion, die den Sensor im permanenten ON-Zustand hält solange nicht ausreichend DctA gebildet wird um den Sensorkomplex zu formen. Diese Art der Regulation ermöglicht, dass adäquate Mengen von DctA vorhanden sind, um DcuS in den betriebsbereiten Zustand zu überführen. Folglich besitzt DctA keine sensorische Funktion, sondern fungiert als ein Signal für DcuS, das der Transporter vorhanden und der Komplex intakt ist. DctA besitzt somit den Charakter eines molekularen Totmannschalters, der die Sensorkinase DcuS nur dann richtig arbeiten lässt, wenn der Transporter auch anwesend ist. Eventuell stellt DctA auch eine Funktion bereit die in DcuS fehlt. Eine Phosphatasefunktion wäre möglich, diese könnte als Gegenspieler der Kinase für eine balancierte Antwort von DcuS nötig sein.

Demnach können für die Funktion der Sensorkinase DcuS unter aeroben Bedingungen 3 Zustände beschrieben werden. In Gegenwart von freiem DcuS (Abb. D8A) befindet sich der Sensor im permanenten ON-Zustand und induziert die Expression von *dctA*, um den DctA/DcuS-Sensorkomplex zu bilden. Der physiologische Hintergrund für diesen Zustand ist momentan noch unbekannt. Der so formierte Sensorkomplex liegt in Abwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren dann im OFF-Zustand vor und ist nun fähig diese Effektoren zu detektieren (Abb. D8B). Die Produktion von DctA wird vorerst durch eine negative Autoregulation verhindert. Die Anwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren aktiviert dann den DctA/DcuS-Sensorkomplex durch Bindung an die PAS_p-Domäne von DcuS (Abb. D8C). Die Effektorbindung ermöglicht die Autophosphorylierung der Histidinkinase und führt schließlich zur Induktion von *dctA* durch den Antwortregulator DcuR. Die zusätzlichen Transporter steigern die Aufnahme der C₄-Dicarbonsäuren und befähigen das Wachstum auf diesen Substraten. Der DctA/DcuS-Sensorkomplex liegt vermutlich unabhängig von der Anwesenheit der Effektoren vor.

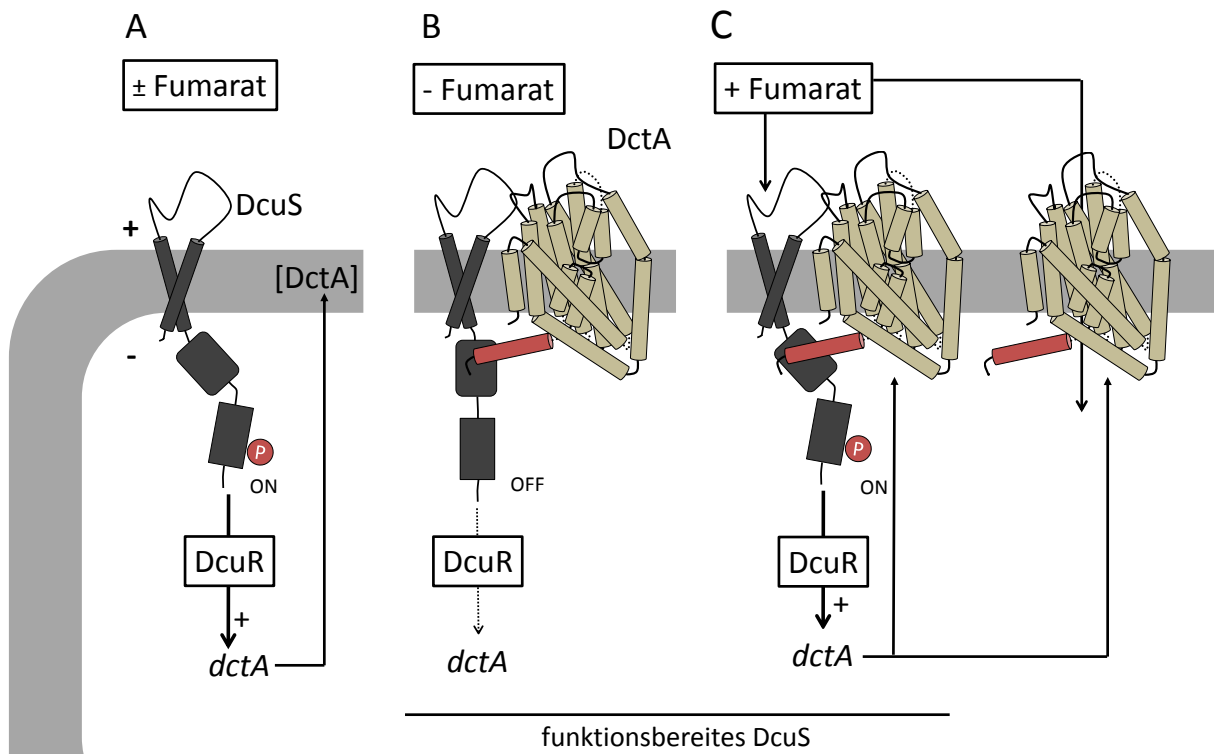


Abb. D8: Modell von DctA als molekularer Totmannschalter für den Funktionszustand von DcuS. (A) Freies DcuS, welches in DctA-defizienten Stämmen bzw. nach der Synthese vorkommt, befindet sich permanent im ON-Zustand und sorgt somit für die Bildung von DctA für den DctA/DcuS-Sensorkomplex. (B) Der DctA/DcuS-Sensorkomplex liegt in Abwesenheit von C_4 -Dicarbonsäuren wie Fumarat im OFF-Zustand vor und die Produktion von DctA wird eingestellt. (C) Die Gegenwart von Fumarat aktiviert den Sensorkinase DcuS und die zusätzlich gebildeten DctA-Transporter katalysieren die Aufnahme der C_4 -Dicarbonsäuren.

Im Großen und Ganzen verläuft die transkriptionelle Regulation von *dctA* durch die Histidinkinase DcuS in zwei Schritten. Zunächst unterliegt DcuS einer Autoregulation und wird vom permanenten ON-Zustand in den funktionsbereiten Zustand des DctA/DcuS-Sensorkomplexes überführt. Im zweiten Schritt kann dann die Anwesenheit der Effektoren durch DcuS im DctA/DcuS-Sensorkomplex detektiert werden und die Produktion des Symporters DctA induzieren. Dieser zweiteilige Mechanismus ermöglicht eine sehr effiziente Regulation.

Interessanterweise treten bei den Histidinkinasen der DcuS/CitA-Familie Variationen der Signaltransduktion des DctA/DcuS-Sensorkomplexes auf. Der DcuS-homologe C_4 -Dicarbonsäure-Sensor DctS aus *Bacillus subtilis* benötigt zusätzlich zum Transporter DctA das extracytoplasmatische Bindeprotein DctB für die funktionsfähige dreigliedrige Sensoreinheit (Graf et al. 2014). Die Histidinkinase CitA aus *E. coli* kommt hingegen ganz ohne Kosensoren aus (Gerharz et al. 2003; Scheu et al. 2012).

5.2 Die Transmembrandomänen von DcuS

Integrale Membranproteine machen ungefähr 15-30 % der offenen Leserahmen eines jeden Organismus aus (Liu & Rost 2001; Wallin & Heijne 1998) und können in der Membran von *E. coli* ein Protein-Lipidverhältnis von 1:3 erreichen (Goodsell 1991). Trotz der Häufigkeit von Membranproteinen, ihres essentiellen biologischen Charakters sowie ihrer Anwendung in der Medizin und Biotechnology ist über die Struktur und Faltung von Membranproteinen noch relativ wenig bekannt. Die stetig wachsende Anzahl von Membranproteinstrukturen zusammen mit Untersuchungen zum Mechanismus ihrer Faltung weisen darauf hin, dass Wechselwirkungen zwischen den Transmembranhelices eine essentielle Rolle für deren Funktion und Struktur spielen (Langosch & Arkin 2009; Li et al. 2012; Cymer et al. 2012). Diese Interaktionen zwischen den Transmembrandomänen werden einerseits durch spezifische Sequenzmotive und andererseits durch die Eigenschaften der Biomembranen beeinflusst.

Die Transmembranhelices TM1 und TM2 der Histidinkinase DcuS flankieren die periplasmatische Sensordomäne PAS_p. Bislang war außer der Lage der beiden Transmembrandomänen lediglich deren Sequenz bekannt. Als Bestandteil dieser Arbeit wurden weitere Funktionen von TM1 und TM2 abgesehen von der Integration von DcuS in der Membran von *E. coli* geprüft.

5.2.1 Sequenzanalyse der Transmembranhelices von DcuS

Die Sequenzanalyse der Transmembranhelices der Sensorkinasen der CitA-Familie offenbart eine Abundanz von GxxxG- bzw. SmallxxxSmall-Sequenzmotiven in DcuS und seinen homologen Sensorkinasen. In den CitA-Proteinen hingegen treten nur in TM2 einige dieser Motive auf. Die Anhäufung von Sequenzmotiven des SmallxxxSmall-Typs ist typisch für Transmembrandomänen. In α -Helices und primär in Transmembranhelices sind solche Sequenzmotive überrepräsentiert (Kleiger et al. 2002; Senes et al. 2000). Häufig bilden Motive dieser Art Strukturen aus, die als Rahmen für Helix-Dimerisierungen fungieren (Russ & Engelman 2000). Die Anlagerung der TMs mit SmallxxxSmall-Motiven erfolgt nach dem Modell „ridge-into-groove“ bzw. „knob-into-hole“ und ermöglicht eine sehr enge Packung der TMs (Walther et al. 1996; Langosch & Heringa 1998). Die Existenz des AxxxG-Motivs in TM1 sowie des SxxxGxxxG-Tandemmotivs in TM2 deuten demnach auf

Dimerisierungsschnittstellen in den Transmembrandomänen von DcuS aus *E. coli* hin. Vor allem das SxxxGxxxG-Sequenzmotiv der TM2, das in Polyleucin-TMs eine starke Homodimerisierung vermittelte (Russ & Engelman 2000), stellt einen vielversprechenden Kandidaten für eine Interaktionsschnittstelle dar. Zudem ist bei polytopischen Membranproteinen die Sequenzvariation an Kontaktstellen der TMs mit der Membran höher als an TM-TM-Dimerisierungsschnittstellen (Stevens & Arkin 2001). Demzufolge kann das konzentrierte Auftreten der SmallxxxSmall-Motive in TM2 der DcuS-homologen Sensoren als ein weiteres Indiz für die Dimerisierung dieser Transmembrandomäne gesehen werden. Mit den QxxS-Motiven der TM2 von CitA aus *K. pneumoniae* und *Salmonella typhi* konnte ein weiteres Sequenzmotiv, das Interaktionen zwischen TMs fördert, identifiziert werden. Das polare Sequenzmotiv ist jedoch nicht in CitA-Kinasen aus *E. coli* und *Geobacillus thermodenitrificans* konserviert, dort treten wiederum SmallxxxSmall-Motive auf. Bei den Transmembranhelices 1 hingegen traten lediglich in den DcuS-homologen Sensoren SmallxxxSmall-Motive auf. In den CitA-Sensoren konnten in TM1 keine Interaktionsvermittelnden Sequenzmotive bestimmt werden. Folglich weisen alle TM2 der analysierten Sensorkinasen der CitA-Familie sowie die TM1 der DcuS-Homologen mindestens ein Sequenzmotiv des SmallxxxSmall- bzw. QxxS-Typs auf und stellen potentielle Dimerisierungsschnittstellen der Histidinkinasen dar.

5.2.2 Die Dimerisierungsschnittstelle des GpA-Dimers

Die Homodimerisierung der Transmembrandomänen des humanen, bitopischen Membranproteins Glycophorin A, welches ebenfalls ein GxxxG-Sequenzmotiv besitzt, wurde bereits ausführlich untersucht (Lemmon et al. 1992a; Lemmon et al. 1992b; Lemmon et al. 1994; Langosch et al. 1996; Russ & Engelman 1999) und stellt somit ein ideales Modellprotein für die TM-TM-Dimerisierung von DcuS dar. Aufwendige Deletions- und gerichtete Mutagenesestudien zeigten sequenzabhängige Dimerisierung von GpA (Lemmon et al. 1992a; Lemmon & Engelman 1992). Vor allem Substitutionen an den Positionen L75, I76, G79, G83, V84 und T87 mit anderen hydrophoben Aminosäuren führten zu einer reduzierten Dimerisierung der GpA-Monomere. Durch die NMR-Strukturen der Transmembrandomänen-Dimere von GpA konnte diese Interaktionsoberfläche mit dem GxxxG-Motiv als Kern der Dimerisierungsschnittstelle bestätigt werden (MacKenzie et al.

1997; Smith et al. 2001). Die beiden Glycinreste G79 und G83 bilden eine flache Oberfläche auf einer Helixseite (Abb. D9). In diese Furche können sich dann Erhebungen der Partnerhelix anlagern, dadurch ist eine sehr enge Packung der Transmembrandomänen gewährleistet. Die Interaktion zwischen den TMs wird zusätzlich durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräften der benachbarten Aminosäurereste stabilisiert (Schneider & Engelman 2004; Doura et al. 2004; Melnyk et al. 2004). Des Weiteren wird diskutiert, dass die C_{α} -Atome der Glycinreste, aufgrund der geringen Distanz zwischen den Transmembranhelices Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Carbonylsauerstoff des Peptidrückgrats der benachbarten Transmembrandomäne ausbilden und das Dimer so stabilisieren (Senes et al. 2001).

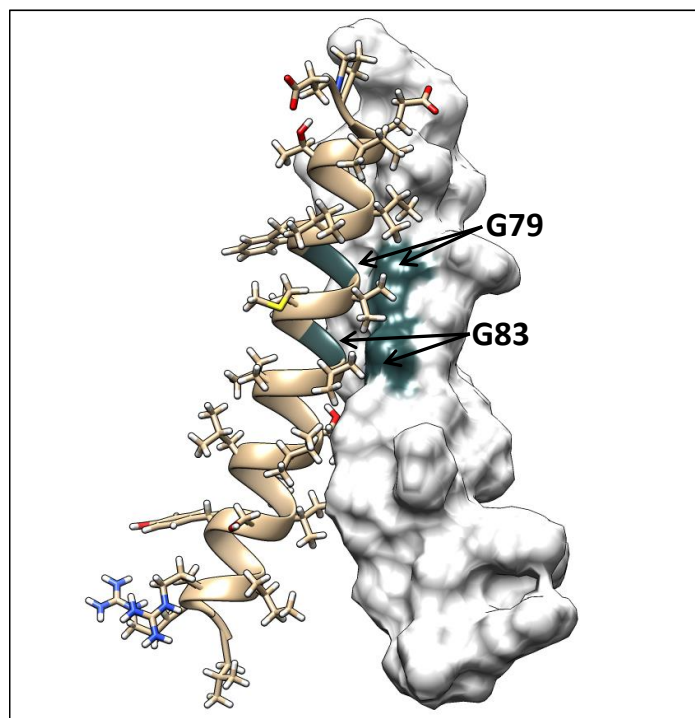


Abb. D9: Struktur des GpA TM-Dimers. Die NMR-Struktur des Transmembrandomänen-Dimers von humanen Glycophorin A (Mineev et al. 2011a; PDB ID: 2KPE) wurde mit dem Programm UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) bearbeitet und visualisiert. Eine der beiden Transmembrandomänen ist als Helix mit den Aminosäureseitenketten dargestellt (beige), die andere TM ist in der Oberflächenansicht (hellgrau) abgebildet. Die Glycinreste G79 und G83 sind dunkelgrün gekennzeichnet.

5.2.3 Funktionsvarianten der Transmembranhelices 1 und 2 von DcuS

In den beiden Transmembrandomänen der Sensorkinase DcuS wurden insgesamt 19 Aminosäureaustausche an 16 Positionen durchgeführt. Die Mutationen der SmallxxxSmall-Sequenzmotive sowie deren Umgebung können grob in drei Gruppen von Funktionsvarianten der Sensorkinase unterteilt werden (Abb. D10). Dabei war die Funktion

von DcuS in allen Varianten mindestens teilweise vorhanden. Die Mehrheit der DcuS-Varianten (Gruppe 1; Abb. D10A), darunter alle Substitutionen in TM1 sowie 12 Austausche in TM2, waren in der Lage den DcuS-defekten Stamm IMW260 wie wildtypisches DcuS in den Expressionsuntersuchungen zu komplementieren. Bei den Varianten DcuS(G194A) und DcuS(G194/T198A) der Gruppe 2 (Abb. D10B) hingegen ist der Funktionszustand sichtlich gestört. Diese Substitutionen weisen Reporterexpressionen von *dcuB-lacZ* in Gegenwart des Effektors Fumarat auf, die im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle um die Hälfte reduziert sind. Gruppe 3 (Abb. D10C) beinhaltet Varianten DcuS(S186C/G190A) und DcuS(G190A/G194A) und diese besitzen in Gegenwart von Fumarat lediglich ein Sechstel der Reporterexpression von wildtypischen DcuS. Die erheblichen Funktionsdefekte der DcuS-Varianten der Gruppe 2 und 3 können durch die gestörte Homodimerisierung der DcuS-Monomere oder durch fehlerhaften Signaltransfer von TM2 an PAS_C hervorgerufen werden. Der Funktionszustand von Histidinkinasen wie DcuS ist abhängig von der Dimerisierung der Monomere, da nach Signaleingang eine Transautophosphorylierung zwischen den Interaktionspartnern stattfindet (Gao & Stock 2009). Beachtenswert sind zudem die Positionen der beeinträchtigten Varianten der Gruppe 2 und 3, da bei diesen stets mindestens eine Aminosäure des SxxxGxxxG-Motivs der TM2 substituiert wurde. Die Funktionsvarianten festigen also die Annahme, dass das SxxxGxxxG-Tandemmotiv als Interaktionsschnittstelle in TM2 fungiert und die Dimerisierung dieser TM ermöglicht.

Um die Substitution G190A/G194A umfassender zu charakterisieren, wurde diese mit OFF- sowie ON-Varianten von DcuS kombiniert und deren Funktionszustand analysiert. Die Kombination von OFF-Varianten mit G190A/G194A hatte stets den OFF-Phänotyp zur Folge. Also stören die OFF-Mutationen H110A, V276A und L300A die noch verbleibende Funktion der Variante DcuS(G190A/G194A) vollständig und das DcuSR-System befindet sich, wie im DcuS-defekten Stamm IMW260, kontinuierlich im OFF-Zustand. Dabei inhibieren die Substitutionen V276A und L300A die Kinasedomäne vermutlich durch strukturelle Veränderungen in PAS_C und der Austausch H110A stört wahrscheinlich die Bindung der Effektoren in PAS_P. Im Gegensatz dazu zeigten die kombinierten ON-Varianten DcuS(G190A/G194A/N248D) und DcuS(G190A/G194A/N304D) wieder deutliche Induktionen des Reportergens *dcuB-lacZ*. Die partielle Wiederherstellung des Funktionszustandes in diesen kombinierten ON-Varianten könnte ebenfalls das Resultat einer fehlerhaften Dimerisierung der DcuS-Monomere sein. Dadurch wird die permanente

Transautophosphorylierung der ON-Mutationen N248D und N304D gestört. Die Konformationsänderung der Protomere nach Bindung von Fumarat in PAS_p könnte die gegenseitige Aktivierung der Partnerkinasen wieder begünstigen und zu einer Expressionssteigerung von *dcuB-lacZ* führen.

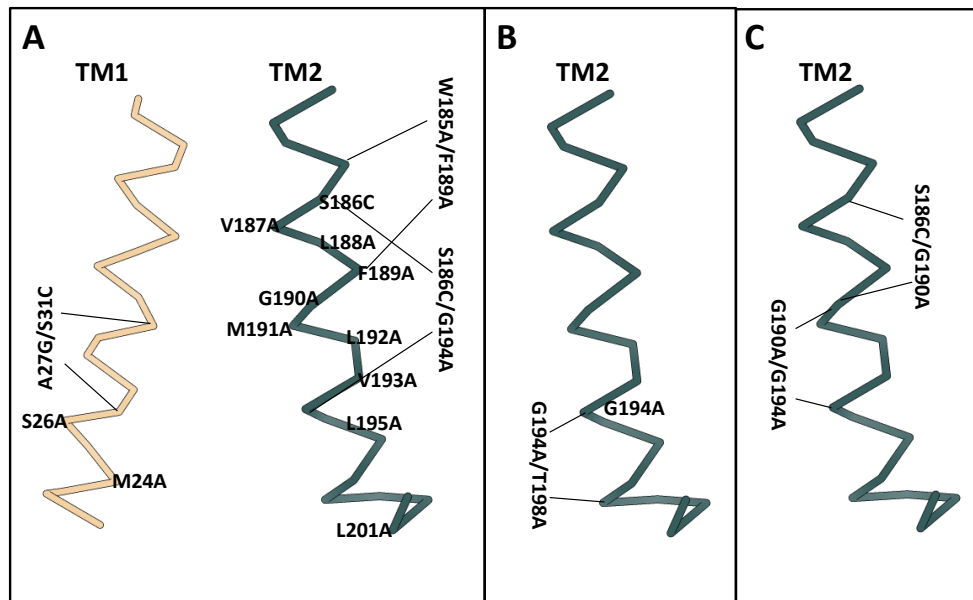


Abb. D10: Gruppierung und Lage der Funktionsvarianten in den Transmembrandomänen 1 und 2 von DcuS. Die Strukturmodelle von TM1 (beige) und TM2 (dunkelgrün) wurden vom *ab initio* Proteinstrukturvorhersage Server QUARK ONLINE (Xu & Zhang 2012) modelliert und mit dem Programm UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) dargestellt. Die Positionen der Funktionsvarianten sind angegeben. (A) Gruppe 1; (B) Gruppe 2; (C) Gruppe 3.

Die Funktionsanalysen und vor allem die Varianten DcuS(S186C/G190A) und DcuS(G190A/G194A) demonstrieren die Relevanz des SxxxGxxxG-Tandemmotivs der TM2 für die Funktion der Histidinkinase DcuS. Zudem untermauern diese Varianten der Gruppe 3 die Vermutung, dass dieses Sequenzmotiv, das als aussichtsreicher Kandidat für ein interaktionsvermittelndes SmallxxxSmall-Motiv in der Sequenzanalyse identifiziert wurde, eine mögliche Interaktionsschnittstelle von TM2 darstellt. Der Funktionsverlust der Varianten kann folglich durch eine reduzierte Wechselwirkung zwischen den Monomeren des DcuS-Dimers erklärt werden. Die Transautophosphorylierung von Histidinkinasen wie DcuS erfolgt gegenseitig zwischen den Partnerkinasen. Deshalb ist die Dimerisierung der Monomere essentiell für die Funktion dieser Sensorkinasen (Qin et al. 2000; Gao & Stock 2009). Dementsprechend besitzt monomeres, in Detergenz solubilisiertes DcuS, keine Kinaseaktivität mehr (Janausch et al. 2002b; Scheu 2009). Aufgrund der Expressionsanalyse und Lokalisierungsstudien der Substitutionen S186C/G190A und G190A/G194A kann zudem

eine fehlerhafte Expression sowie Membranintegration dieser Varianten als möglicher Grund für die gestörte Funktion ausgeschlossen werden. Eine alternative Erklärung wäre, dass der Signaltransfer vom Periplasma ins Cytoplasma durch die Substitutionen in TM2 gestört ist und infolgedessen der Funktionszustand von DcuS beeinträchtigt ist. In Transmembranhelix 1 konnten hingegen keine Funktionsmutanten von DcuS bestimmt werden. Die Mutation A27G/S31C des SmallxxxSmall-Motivs hatte keine Auswirkung auf die Funktion von DcuS.

5.2.4 Interaktionsstudien der Transmembrandomänen TM1 und TM2

DcuS liegt als Dimer bzw. Tetramer in der Membran von *E. coli* vor (Scheu et al. 2010a). Dieser oligomere Zustand von DcuS konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden und ist unabhängig vom Effektor Fumarat. Die verantwortlichen Dimerisierungsstellen sind im gesamten Protomer verteilt. So wiesen die Kristallstrukturen der isolierten periplasmatischen PAS-Domänen von DcuS und der verwandten Sensorkinase CitA Dimere auf (Cheung & Hendrickson 2008; Sevvana et al. 2008). Der Beitrag von PAS_c und der Kinasedomäne an der Dimerisierung von DcuS wurde ebenfalls diskutiert (Etzkorn et al. 2008; Kneuper et al. 2010) und konnte anhand von sequentiellen Verkürzungen ausgehend vom C-Terminus von DcuS sowie einem PAS_c-Kinase-Konstrukt in BACTH-Interaktionsstudien gezeigt werden (Monzel et al. 2013). Die Bedeutung der Transmembranhelices 1 und 2 für den oligomeren Zustand von DcuS war bisher unbekannt. Die Identifizierung der SmallxxxSmall-Sequenzmotive in TM1 und TM2 sowie die Charakterisierung der Funktionsmutanten von TM2 DcuS(S186C/G190A) und DcuS(G190A/G194A) weisen auf eine Beteiligung der Transmembrandomänen zur Oligomerisierung der Sensorkinase DcuS hin.

5.2.4.1 Die Auswirkung von Substitutionen in TM1 und TM2 auf die Dimerisierung von DcuS

Der Einfluss von Substitutionen in TM1 und TM2 auf die Homodimerisierung von DcuS wurden im BACTH-System untersucht. Für DcuS und alle Varianten wurden Homodimerisierungen nachgewiesen, es traten jedoch Unterschiede in der Stärke der Wechselwirkung auf. Die Mehrheit der Mutanten wies keine oder nur eine geringe

Beeinträchtigung der Homodimerisierung auf. Lediglich die TM2-Mutationen G194A und G190A/G194A, die bereits in der Funktion von DcuS gestört waren, hatten wesentliche Interaktionsverluste bei den BACTH-Messungen zur Folge. In diesen Varianten korreliert folglich der Funktionsverlust von DcuS mit einer Störung der DcuS-Dimerisierung und könnte in der reduzierten Interaktion der Monomere begründet liegen. Für die Mutation S186C/G190A, die ebenso wie Austausch G190A/G194A eine sehr starke Störung des Funktionszustandes von DcuS besaß, konnte allerdings kein Einfluss auf die Interaktion des DcuS-Dimers festgestellt werden. Der Effekt der Doppelsubstitutionen S186C/G190A und G190A/G194A auf die Homodimerisierung war auch mit den verkürzten DcuS-Konstrukten DcuS-TM2-T18 und DcuS-TM2-T25 zu sehen. Demnach ist die Homodimerisierung dieser beiden Varianten unabhängig von den cytoplasmatischen Domänen PAS_C und Kinase.

Der Effektor Fumarat hatte erwartungsgemäß keinen nennenswerten Einfluss auf die Homodimerisierung der meisten DcuS-Varianten. Dies steht im Einklang mit bisherigen Untersuchungen, bei denen die Wechselwirkung der DcuS-Monomere unabhängig von Fumarat war (Scheu et al. 2010a; Monzel et al. 2013). Ausschließlich bei Substitution S186C/G190A kommt es in Gegenwart von Fumarat zu einer merklichen Störung der Interaktion des DcuS-Dimers. Bei dieser Mutante geht also der Funktionsverlust mit einem vermeintlichen Fumarat-induzierten Verlust der Homodimerisierung einher. Inwiefern sich der vermeintliche Kolbenhub von TM2 nach Bindung von Fumarat in der periplasmatischen Sensordomäne auf die Dimerisierung von TM2 auswirkt ist unbekannt.

5.2.4.2 Die Dimerisierung von TM1 und TM2

Die Interaktion der Transmembrandomänen TM1 und TM2 wurde mithilfe des GALLEX-Testes für Helices mit einer Länge von 16 Aminosäuren nachgewiesen. Die Homodimerisierung von TM1 war jedoch im Vergleich zur TM2-TM2-Wechselwirkung nur sehr schwach. Folglich hat TM2 einen größeren Beitrag an der Dimerisierung von DcuS als TM1. Obendrein bewirkten die Mutationen S186C/G190A und G190A/G194A den Interaktionsverlust des TM2-TM2-Dimers. Demnach korreliert die Störung der TM2-Homodimerisierung beider Doppelmutanten der GALLEX-Studien mit dem Funktionsverlust der Varianten DcuS(S186C/G190A) sowie DcuS(G190A/G194A) und unterstreicht die Rolle des SxxxGxxxG-Tandemmotivs als Dimerisierungsschnittstelle von TM2. Damit unterscheiden

sich die BACTH- und GALLEX-Interaktionsstudien lediglich in ihren Ergebnissen zu Substitution S186C/G190A. Beim BACTH-Test besitzt dieser Austausch keine Auswirkung auf die Homodimerisierung von DcuS. Es wurde jedoch eine Fumarat-induzierte Störung der DcuS-DcuS-Wechselwirkung der Variante DcuS(S186C/G190A) im BACTH-System nachgewiesen.

Alles im allem demonstrieren die Ergebnisse der BACTH- und GALLEX-Studien die Bedeutung von TM2 für die Wechselwirkung der DcuS-Monomere und bestätigen das SxxxGxxxG-Tandemmotiv als Interaktionsschnittstelle von TM2 (Abb. D11A). Die TM1-Dimerisierung (Abb. D11B) scheint im Gegensatz dazu nur eine geringe Rolle bei der DcuS-DcuS-Interaktion zu spielen. Analog zu GpA haben Substitutionen der Glycinreste G190 und G194 des SxxxGxxxG-Sequenzmotivs eine reduzierte Dimerisierung von DcuS und TM2 zur Folge. Die gestörte DcuS-Homodimerisierung der Varianten mit G194A und G190A/194A geht außerdem mit dem Funktionsverlust einher. Die Methylgruppen der Alaninaustausche behindern vermutlich die enge Packung der Transmembrandomäne TM2 (Abb. D11CD). Die Substitutionen von Glycin zu Alanin könnten zudem den Verlust der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem C_α der Glycinreste und dem Peptidrückgrat der benachbarten Transmembrandomäne zur Folge haben. Dies führt zu einer weiteren Schwächung der Assoziation der Transmembranhelices und letztendlich auch der Homodimerisierung von DcuS. Der Austausch S186C/G190A hingegen wirkt sich scheinbar nur in Gegenwart des Effektors Fumarat auf die Wechselwirkung des Homodimers aus. Dennoch stört diese Mutation die Homodimerisierung von TM2 (Abb. D11E) entscheidend. Eine mögliche Erklärung für den Funktionsverlust von DcuS(186C/G190A) ist eine Störung der Signaltransduktion durch die veränderte TM2-Struktur. SCAM-Zugänglichkeitsstudien mit DcuS weisen auf eine vektorielle Verschiebung von TM2 nach Bindung des Effektors Fumarat um eine Ganghöhe hin (Monzel unveröffentlicht). Der Kolbenhub sollte eine Veränderung der Interaktion des TM2-Dimers im Protein zur Folge haben. Offensichtlich beeinflusst dies die Variante S186C/G190A nur in Gegenwart von Fumarat. Ein Wechsel zwischen SmallxxxSmall-Motiven als Interaktionsschnittstellen für unterschiedliche Funktionszustände wurde bereits für die humane Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB2 diskutiert (Fleishman et al. 2002; Escher et al. 2009; Cymer and Schneider 2010). Demzufolge soll das T₆₅₂xxxS₆₅₆xxxG₆₆₀-Motiv den aktiven Zustand und G₆₆₈xxxG₆₇₂ den inaktiven Zustand von ErbB2 stabilisieren.

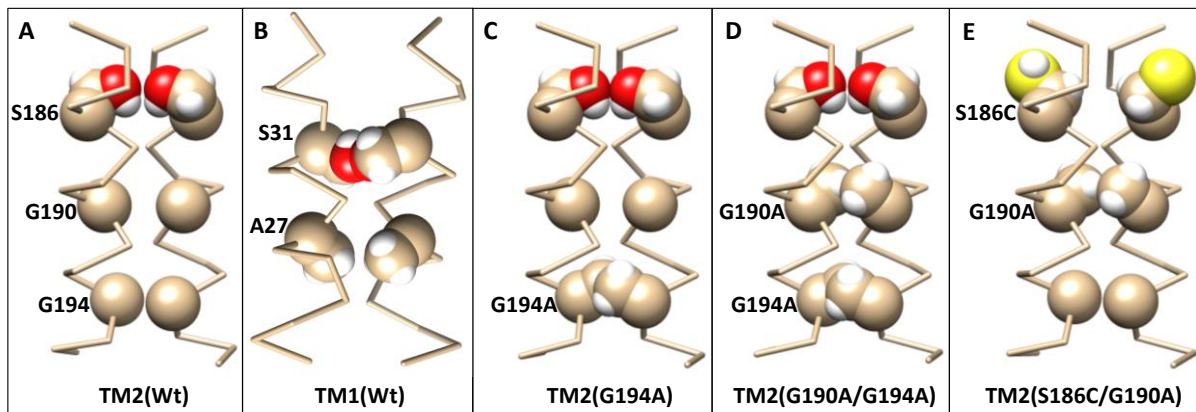


Abb. D11: Strukturmodelle der TM1- und TM2-Homodimere im DcuS-Dimer. Die 3D-Strukturmodelle von TM1 und TM2 wurden vom *ab initio* Proteinstrukturvorhersage Server QUARK ONLINE (Xu & Zhang 2012) erstellt. Die TM-Strukturen wurden mit dem Programm UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004) bearbeitet. Die Transmembranhelices sind als Peptidrückgrad und die Seitenketten der Aminosäuren des SmallxxxSmall-Motivs sind als Kugeln (Sauerstoffatome: rot; Schwefelatome: gelb; Wasserstoffatome: weiß; Kohlenstoffatome: beige) dargestellt. Mit der Matchmaker-Funktion von UCSF Chimera und dem GpA-Homodimer (Mineev et al. 2011a; PDB ID: 2KPE) wurden die monomeren TM-Strukturmodelle zum jeweiligen Homodimer modelliert. Das Strukturmodell von TM1 beinhaltet Aminosäuren 21-36 und die TM2-Varianten Aminosäuren 182-197 von DcuS. (A) TM2(Wt); (B) TM1(Wt); (C) TM2(G194A); (D) TM2(G190A/G194A); (E) TM2(S186C/G190A).

5.2.5 Interaktionsmodell von DcuS

Die Dimerisierung von Transmembrandomänen spielt eine wichtige Rolle bei signaltransferierenden Membranproteinen. Die Wechselwirkungen zwischen den TMs werden dabei oft durch Sequenzmotive vermittelt und stabilisiert. Beim Aspartatchemotaxis-Rezeptor Tar aus *E. coli* sorgt beispielsweise ein polares QxxS-Sequenzmotiv für die Homodimerisierung der TM1 der Tar-Monomeren im Dimer (Sal-Man et al. 2004). Ein Leucin-Zipper-ähnliches Motiv fungiert hingegen als Interaktionsschnittstelle der Transmembrandomäne des Erythropoetin-Rezeptors der Maus (Ruan et al. 2004). Die Kristallstrukturen der Rezeptor-Tyrosinkinase Homodimere EphA1 (Bocharov et al. 2008a) und ErbB2 (Bocharov et al. 2008b) sowie die Heterodimere von Integrin $\alpha\text{IIb}/\beta\text{3}$ (Lau et al. 2009; Yang et al. 2009) und der Rezeptor-Tyrosinkinasen ErbB1/ErbB2 (Mineev et al. 2010) zeigen Helix-Helix-Anlagerungen durch SmallxxxSmall-Sequenzmotive.

Solche GxxxG-artigen Motive wurden auch in den Transmembrandomänen TM1 und TM2 der Sensorhistidinkinase DcuS identifiziert. Die Dimerisierung von Histidinkinasen wie DcuS ist essentiell für deren Funktion, da nach Signalerkennung die Transphosphorylierung der Partnerkinase erfolgt (Gao & Stock 2009). Anhand der Charakterisierung der Transmembrandomänen von DcuS kann folgendes Interaktionsmodell des DcuS-Dimers abgeleitet werden (Abb. D12). Die SxxxGxxxG-Tandemotive der Transmembranhelices 2

formen Interaktionsoberflächen, welche eine enge Packung dieser Transmembrandomänen der DcuS-Monomere nach dem „knob-into-hole“ Modell (Langosch & Heringa 1998) ermöglichen. Analog zu GpA kann die TM2-TM2-Assoziation durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräften entlang der Interaktionsschnittstelle und der umliegenden Aminosäurereste ausreichend gefestigt werden. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem C α der Glycinreste G190 sowie G194 und dem Peptidrückgrat der Partnerhelix stabilisieren zusätzlich die Berührungsfläche der Transmembrandomänen. Die TM2-Dimerisierung ermöglicht zudem den Kontakt zwischen den Interaktionsstellen der PAS_p, PAS_c sowie Kinasedomäne und bewerkstelligt dadurch die Bildung des symmetrischen DcuS-Dimers (Abb. D12A). Das DcuS-Dimer ist also funktionsfähig. Die Bindung von Effektoren in PAS_p der Sensorkinasen hat die Signaltransduktion durch TM2 über die Membran zur Folge. Diese erfolgt wahrscheinlich über eine vektorielle Verschiebung von TM2 in Richtung des Periplasmas. Dabei ändern sich durch den Kolbenhub die Wechselwirkungen zwischen TM2-TM2 des DcuS-Dimers. Dieser Signaltransfer ins Cytoplasma führt dazu, dass der inhibitorische Effekt von PAS_c auf die Kinasedomäne aufgehoben wird und es kommt zur Transautophosphorylierung der Partnerkinase. Der oligomere Zustand von DcuS würde sich folglich aus mehreren dieser Dimere zusammensetzen.

Die Mutationen G194A und G190A/G194A stören die TM2-Assoziation durch ihre Modifikation der TM2-Dimerisierungsschnittstelle erheblich. Die enge Packung von TM2-TM2 wird durch die Methylgruppen der Substitutionen verhindert. Ferner wird die TM2-TM2-Wechselwirkung durch den Verlust der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen C α der Glycinreste und dem Peptidrückgrat durch die Alaninaustausche destabilisiert. Die geschwächte TM2-Dimerisierung hat eine fehlerhafte Anlagerung der DcuS-Monomere in der Membran zur Folge und stört damit die Wechselwirkungen der Interaktionsstellen von PAS_p, PAS_c sowie der Kinasedomäne (Abb. D12B). Als Resultat der defekten Anordnung der DcuS-Monomere im Dimer wird in Gegenwart von Effektoren die Transautophosphorylierung der Partnerkinasen im Vergleich zu wildtypischen DcuS gehemmt und somit der Funktionszustand der Sensorkinasen beeinträchtigt. Bei Substitution S186C/G190A dagegen liegt das DcuS-Dimer in Abwesenheit von Fumarat ungestört vor. Die strukturellen Veränderungen der Sensorkinasen nach Bindung von Effektoren in PAS_p rufen

jedoch einen Interaktionsverlust der Monomere dieser DcuS-Variante hervor, der ebenfalls eine reduzierte Kinaseaktivität der Partnerkinase bewirkt.

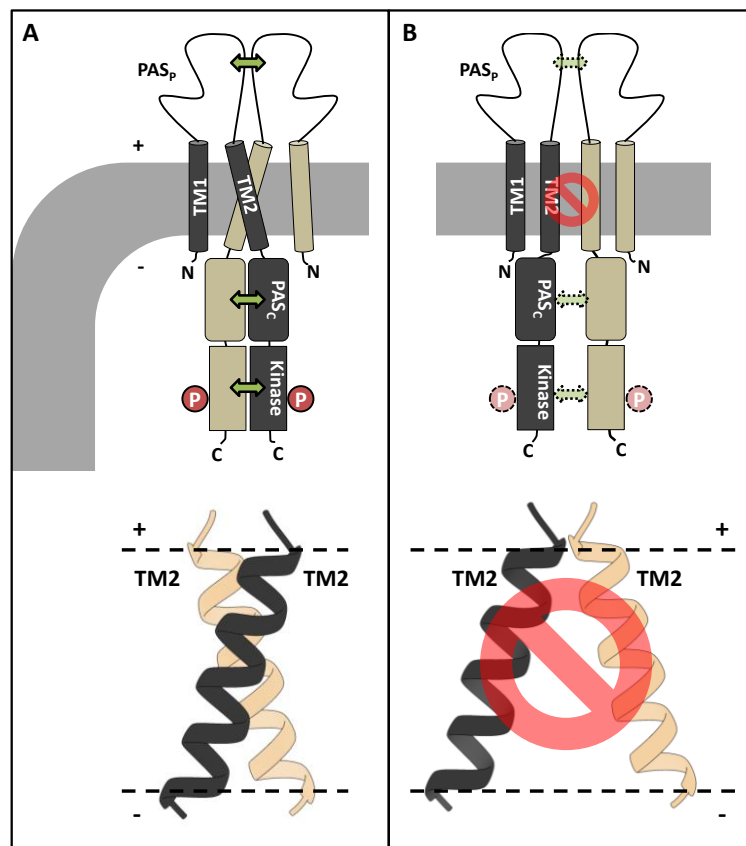


Abb. D12: Dimerisierungsmodell zwischen DcuS-Monomeren. Die grünen Doppelpfeile stellen Wechselwirkungen zwischen den Dimerisierungsstellen von PAS_p, PAS_c und der Kinasedomäne dar. Die roten Kugeln geben die Phosphorylierung der DcuS-Monomere an. Die Pfeile und Kugeln mit gestrichelter Umrandung und hellerer Färbung weisen auf geschwächte Dimerisierung bzw. reduzierte Kinaseaktivität hin. A: Die Dimerisierung von TM2 ermöglicht die korrekte Anlagerung der wildtypischen DcuS-Monomere und erlaubt die Transphosphorylierung der Partnerkinasen. B: Mutationen des SxxxGxxxG-Motivs von TM2 destabilisieren die TM2-TM2-Packung und haben die fehlerhafte Anordnung der DcuS-Monomere zur Folge. Die geschwächte DcuS-Dimerisierung resultiert schließlich im reduzierten Funktionszustand von DcuS.

TM2 mit dem SxxxGxxxG-Tandemmotiv stellt demzufolge die zentrale Dimerisierungsstelle in DcuS dar und initiiert die korrekte Anlagerung der DcuS-Monomere in der Membran. Dass die weitverbreiteten SmallxxxSmall-Motive jedoch nicht zwangsläufig essentielle Interaktionsschnittstellen in TMs von Membranproteinen bilden, beweist das AxxxS-Motiv von TM1. Bei den TM-Dimeren der Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB3 sowie EphA2 spielen die vorhandenen SmallxxxSmall-Motive ebenfalls keine Rolle bei deren Dimerisierung (Mineev et al. 2011b; Bocharov et al. 2010). Des Weiteren ist eine Heterodimerisierung zwischen TM1 und TM2 von DcuS über diese und zusätzliche Interaktionsflächen nicht auszuschließen. Solche Wechselwirkungen könnten an der Stabilisierung der Monomere, Dimere sowie

Oligomere von DcuS beteiligt sein oder TM2 bei dem Kolbenhub nach Effektorbindung stabilisieren. Inwiefern die Komposition und Umgebung der Membran sich auf die Dimerisierung der Transmembrandomänen von DcuS und somit auch auf das DcuS-Oligomer auswirken, ist noch unklar. So können unter anderem die Eigenschaften einer Membran wie deren Dicke, Fluidität, Symmetrie und Zusammensetzung Einfluss auf die Dimerisierung von TMs besitzen (Cymer et al. 2012).

5.3 Der DauA/DctA/DcuS/DcuR-Komplex

Die polare Anreicherung von DcuS wurde bereits ausführlich untersucht, ohne jedoch die zellulären Faktoren für diese Distribution zu identifizieren (Scheu et al. 2008; Scheu unveröffentlicht). Nach diesen Untersuchungen sind zellspezifische Eigenschaften wie die Zellkrümmung, Cardiolipingehalt der Polregionen, Zellteilungsmaschinerie sowie das Zytoskelettprotein MreB nicht für die Bildung der DcuS-YFP-Cluster an den Zellpolen verantwortlich. Deletionen der DcuS-assoziierten Proteine DcuR und DctA sowie der polar angereicherten MCPs und CitA hatten ebenfalls keine Auswirkung auf die Lokalisierung von DcuS-YFP. Ferner konnte in dieser Arbeit die Dimerisierung durch YFP sowie die Anwesenheit des Transporters DauA als mögliche Faktoren für die Bildung der polaren DcuS-YFP-Cluster ausgeschlossen werden.

Aktuelle Untersuchungen mit DcuS-YFP bei physiologischen Konzentrationen der Histidinkinase und unter Verwendung hochauflösender Fluoreszenzmikroskope weisen darauf hin, dass die polaren Cluster von DcuS-YFP transient sind (Dempwolff unveröffentlicht). DcuS-YFP bewegt sich demnach in der gesamten Zellmembran, es verweilt jedoch an den Polen länger als in den anderen Bereichen. Die zuvor betrachteten statischen Anhäufungen von DcuS an den Zellpolen sind wohl das Produkt aus der schlechteren Auflösung der Fluoreszenzmikroskope und der zwangsläufig erhöhten Expression von DcuS-YFP.

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Lokalisierungsstudien dieser Arbeit mussten die Proteine ebenfalls über das physiologische Niveau exprimiert werden, um ein deutliches Fluoreszenzsignal zu erhalten. Die cytoplasmatische Verteilung der funktionalen DcuR-Fusion YFP(A206K)-linker-DcuR in der gesamten Zelle, konnte jedoch auch bei physiologischen

Konzentrationen bestätigt werden (Dempwolff unveröffentlicht). Diese homogene Distribution ist typisch für cytoplasmatische Proteine und steht im Einklang mit der Vorstellung, dass sich der Antwortregulator DcuR in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor frei in der Zelle bewegen muss. Die Koexpression von DcuS hingegen bewirkt die Umverteilung dieser DcuR-Fusion zu polaren Clustern. Die Lokalisierung von YFP(A206K)-linker-DcuR war jedoch stets unabhängig von Fumarat. Dementsprechend kann auch die Distribution von DctA-YFP durch eine erhöhte DcuS-Konzentration modifiziert werden. Die heterogen verteilten DctA-YFP-Cluster verlagern sich bei der Koexpression mit DcuS ebenfalls an die Zellpole. DcuS verfügt demzufolge über die Möglichkeit anhand der bereits beschriebenen Wechselwirkungen mit DcuR (Janausch et al. 2004; Scheu et al. 2012) und DctA (Witan et al. 2012a) die Anordnung dieser Proteine vermutlich durch eine Art „diffusion-and-capture“ Mechanismus (Shapiro et al. 2009; Rudner & Losick 2010) in der Zelle zu beeinflussen.

Interessanterweise lokalisieren sich die YFP-Fusionen des aeroben C₄-Dicarbonsäure-Transporters DauA unter den getesteten Bedingungen analog zu DcuS in Clustern an den Polen und Zellsepten. Ob die beobachteten Cluster der Studien dieser Arbeit temporär oder dauerhaft sind, muss durch zusätzliche Lokalisierungsstudien mit hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopen geklärt werden. Die Verteilung der Fusion YFP(A206K)-DauA war zudem unabhängig von der DcuS-Konzentration. Eine Koexpression von DctA führte allerdings zu einer heterogenen Distribution in der Membran der Zellen. Diese Beobachtung bestätigt die Modellvorstellung von Karinou et al. (2013), dass DauA und DctA eine direkte Protein-Protein-Interaktion eingehen. Folglich konnte mit DauA eine weitere Komponente identifiziert werden, die sich neben DctA, DcuS und DcuR regulatorisch auf den Sensorkomplex auswirkt und mit diesem assoziiert ist.

Das Modell der DctA/DcuS-Sensoreinheit (Witan et al. 2012a) muss also zum Sensor/Regulator-Komplex erweitert werden (Abb. D13). Dabei spielt die Sensorkinase DcuS die zentrale Rolle, da sie mit dem Antwortregulator DcuR und dem Koregulator DctA interagiert und diese im Komplex bindet. Der Großteil von DcuR und DctA werden aber wahrscheinlich in freier Form vorliegen, da diese in höheren Konzentrationen als DcuS in den Zellen vorkommen. Aufgrund des transienten Charakters der polaren DcuS-Cluster, ist zudem davon auszugehen, dass die einzelnen assoziierten Komponenten im

Sensor/Regulator-Komplex bei der Diffusion von DcuS in der Zellmembran ausgetauscht werden. Zwischen DctA und DcuR hingegen treten keine Wechselwirkungen auf (Witan et al. 2012a). Die ebenfalls unter den getesteten Bedingungen polare Lokalisierung von DauA sowie die Interaktion mit DctA, auf dessen Expression sich DauA durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus regulatorisch auswirkt, deuten auf eine Beteiligung von DauA am Sensor/Regulator-Komplex hin. Die genauen Eigenschaften dieser Cluster müssen jedoch noch bei physiologischen Expressionsniveaus untersucht werden. Ob es neben der in dieser Arbeit beschriebenen Interaktion zwischen DauA und DctA noch zu Wechselwirkungen von DauA und DcuS kommt, ist momentan unklar. Bisher konnte lediglich die Interaktion von DauA mit DctA bestätigt werden (Karinou unveröffentlicht). In Tabelle D2 sind die bestätigten Interaktions- sowie Funktionsbeziehungen der Komponenten des DauA/DctA/DcuS/DcuR-Komplexes zusammengefasst.

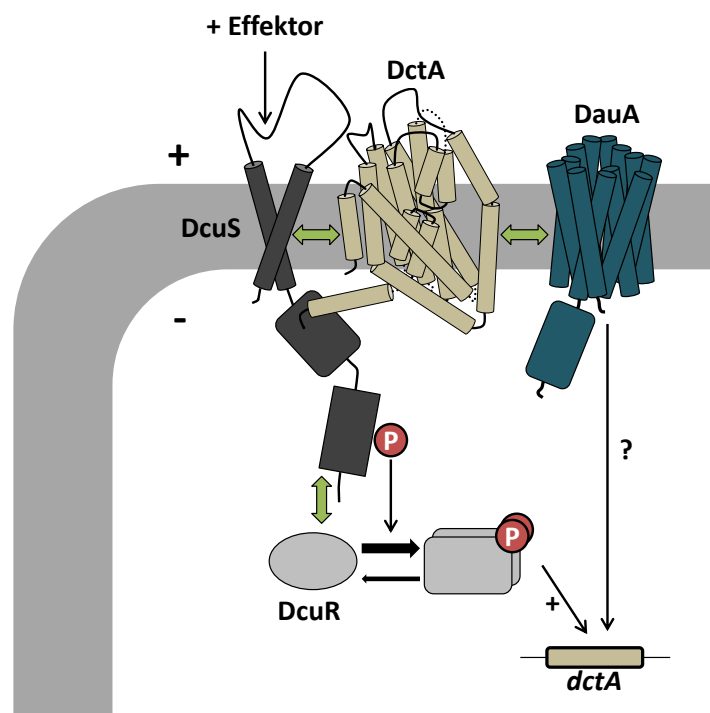


Abb. D13: Modell des DauA/DctA/DcuS/DcuR-Sensor/Regulator-Komplexes. Die grünen Pfeile stellen bestätigte Interaktionen zwischen den Komponenten des Komplexes dar. Die Signaleingangsstelle für C_4 -Dicarbonsäuren im Sensorkomplex ist PAS_p von DcuS. Der Koregulator DctA ermöglicht durch seine Wechselwirkung mit DcuS, dass die Sensorkinase im funktionsbereiten Zustand vorliegt. Nach Bindung der C_4 -Dicarbonsäuren an PAS_p wird DcuS autophosphoryliert. Der Phosphatrest wird anschließend auf DcuR übertragen, welches in seiner phosphorylierten Form die Expression von *dctA* induziert. DauA, welches mit DctA interagiert, beeinflusst über einen noch unbekanntem Mechanismus ebenfalls die Transkription von *dctA*.

Tab. D2: Interaktions- und Funktionsbeziehungen der Komponenten des DauA/DctA/DcuS/DcuR-Sensor/Regulator-Komplexes.

Interaktions-paar	BACTH	FRET	Koimmun-präzipitation	Kolokalisierung	Funktion
DcuS/DcuR	+	n.b.	n.b.	+	+
	(Scheu et al. 2012)			(diese Arbeit)	(Zientz et al. 1998; Janausch et al. 2004)
DcuS/DctA	+	+	+	+	+
	(Witan et al. 2012a)	(Witan et al. 2012a)	(Witan et al. 2012a)	(diese Arbeit)	(Davies et al. 1999; Witan et al. 2012a)
DctA/DauA	+	n.b.	+	+	+
	(Karinou unveröffentlicht)		(Karinou unveröffentlicht)	(diese Arbeit)	(Karinou et al. 2013)

n.b.: nicht bestimmt

Der DauA/DctA/DcuS/DcuR-Sensor/Regulator-Komplex aus *E. coli* stellt allerdings keine Ausnahme in der Regulation des C₄-Dicarbonsäure-Metabolismus dar. Bei *Bacillus subtilis* wurde eine Sensoreinheit beschrieben, bei der neben der Sensorkinase DctS_{BS} und dem Transporter DctA_{BS} noch eine extrazelluläre Bindeproteine DctB_{BS} für den funktionalen Sensorkomplex benötigt wird (Graf et al. 2014). Dort steht ebenfalls die DcuS-homologe Sensorkinase DctS_{BS} im Mittelpunkt, da sie mit allen beteiligten Proteinen interagiert. DctA_{BS} und DctB_{BS} weisen hingegen keine Wechselwirkungen auf. Darüber hinaus wurde die Verwendung von Kosensoren sowie assoziierten Hilfsproteinen für die Funktion von Zweikomponentensystemen bereits ausführlich dokumentiert (Tetsch & Jung 2009; Buelow & Raivio 2010).

6 Literatur

- Abo-Amer, A.E., Munn, J., Jackson, K., Aktas, M., Golby, P., Kelly, D.J., and Andrews, S.C. (2004) DNA Interaction and Phosphotransfer of the C₄-Dicarboxylate- Responsive DcuS-DcuR Two-Component Regulatory System from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **186**: 1879–1889.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, **22**: 195–201.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.*, **2**: 2006.0008.
- Bastug, T., Heinzelmann, G., Kuyucak, S., Salim, M., Vandenberg, R.J., Ryan, R.M., and van Veen, H.W. (2012) Position of the Third Na⁺ Site in the Aspartate Transporter Glt_{ph} and the Human Glutamate Transporter, EAAT1. *PLoS ONE*, **7**: e33058.
- Bauer, J. (2010) The C₄-Dicarboxylate Carriers DcuB and DctA of *Escherichia coli*: Function as Cosensors and Topology. *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Bauer, J., Fritsch, M.J., Palmer, T., and Uden, G. (2011) Topology and Accessibility of the Transmembrane Helices and the Sensory Site in the Bifunctional Transporter DcuB of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **50**: 5925–5938.
- Bernard, R., Guiseppi, A., Chippaux, M., Foglino, M., and Denizot, F. (2007) Resistance to Bacitracin in *Bacillus subtilis*: Unexpected Requirement of the BceAB ABC Transporter in the Control of Expression of Its Own Structural Genes. *Journal of Bacteriology*, **189**: 8636–8642.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **62**: 293–300.
- Bocharov, E.V., Mayzel, M.L., Volynsky, P.E., Goncharuk, M.V., Ermolyuk, Y.S., Schulga, A.A., Artemenko, E.O., Efremov, R.G., and Arseniev, A.S. (2008a) Spatial Structure and pH-dependent Conformational Diversity of Dimeric Transmembrane Domain of the Receptor Tyrosine Kinase EphA1. *Journal of Biological Chemistry*, **283**: 29385–29395.
- Bocharov, E.V., Mineev, K.S., Volynsky, P.E., Ermolyuk, Y.S., Tkach, E.N., Sobol, A.G., Chupin, V.V., Kirpichnikov, M.P., Efremov, R.G., and Arseniev, A.S. (2008b) Spatial Structure of the Dimeric Transmembrane Domain of the Growth Factor Receptor ErbB2 Presumably Corresponding to the Receptor Active State. *Journal of Biological Chemistry*, **283**: 6950–6956.
- Bocharov, E.V., Mayzel, M.L., Volynsky, P.E., Mineev, K.S., Tkach, E.N., and Ermolyuk, Y.S., Schulga, A.A., Efremov, R.G., and Arseniev, A.S. (2010) Left-Handed Dimer of EphA2 Transmembrane Domain: Helix Packing Diversity among Receptor Tyrosine Kinases. *Biophysical Journal*, **98**: 881–889.
- Bock, V. (2004) Substratspezifität und Signaltransduktion des Sensors DcuS von *Escherichia coli*. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Boudker, O., Ryan, R.M., Yernool, D., Shimamoto, K., and Gouaux, E. (2007) Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature*, **445**: 387–393.
- Bowie, J.U. (1997) Helix Packing in Membrane Proteins. *Journal of Molecular Biology*, **272**: 780–789.
- Buelow, D.R., and Raivio, T.L. (2010) Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Molecular Microbiology*, **75**: 547–566.

- Cadwell, R.C., and Joyce, G.F. (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *Genome Research*, **2**: 28–33.
- Chen, H., and Kendall, D.A. (1995) Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *Journal of Biological Chemistry*, **270**: 14115–14122.
- Cheung, J., and Hendrickson, W.A. (2008) Crystal Structures of C₄-Dicarboxylate Ligand Complexes with Sensor Domains of Histidine Kinases DcuS and DctB. *Journal of Biological Chemistry*, **283**: 30256–30265.
- Cymer, F., and Schneider, D. (2010) Transmembrane helix-helix interactions involved in ErbB receptor signaling. *Cell Adh Migr.*, **4**: 299–312.
- Cymer, F., Veerappan, A., and Schneider, D. (2012) Transmembrane helix–helix interactions are modulated by the sequence context and by lipid bilayer properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1818**: 963–973.
- Davies, S.J., Golby, P., Omrani, D., Broad, S.A., Harrington, V.L., Guest, J.R., Kelly, D.J., and Andrews, S.C. (1999) Inactivation and Regulation of the Aerobic C₄-Dicarboxylate Transport (*dctA*) Gene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **181**: 5624–5635.
- DeChancie, J., Shrivastava, I.H., and Bahar, I. (2011) The mechanism of substrate release by the aspartate transporter Glt_{ph}: insights from simulations. *Molecular BioSystems*, **7**: 832.
- Degreif-Dünnwald, P. (2011) PAS_C als signaltransduzierende Domäne des Sensorproteins DcuS von *Escherichia coli*. *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Dmitrova, M., Younès-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr M., and Granger-Schnarr, M. (1998) A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.*, **257**: 205–212.
- Doura, A.K., Kobus, F.J., Dubrovsky, L., Hibbard, E., and Fleming, K.G. (2004) Sequence Context Modulates the Stability of a GxxxG-mediated Transmembrane Helix–Helix Dimer. *Journal of Molecular Biology*, **341**: 991–998.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**: 6127–6145.
- Engel, P., Krämer, R., and Uden, G. (1994) Transport of C₄-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*. Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux. *European Journal of Biochemistry*, **222**: 605–614.
- Engel, P., Krämer, R., and Uden G. (1992) Anaerobic Fumarate Transport in *Escherichia coli* by an *fnr*-Dependent Dicarboxylate Uptake System Which Is Different from the Aerobic Dicarboxylate Uptake System. *Journal of Bacteriology*, **174**: 5533–5539.
- Escher, C., Cymer, F., and Schneider, D. (2009) Two GxxxG-Like Motifs Facilitate Promiscuous Interactions of the Human ErbB Transmembrane Domains. *Journal of Molecular Biology*, **389**: 10–16.
- Etzkorn, M., Kneuper, H., Dünnwald, P., Vijayan, V., Krämer, J., Griesinger, C., Becker, S., Uden, G., and Baldus, M. (2008) Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS. *Nature Structural Molecular Biology*, **15**: 1031–1039.
- Fleishman, S.J., Schlessinger, J., and Ben-Tal, N. (2002) A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**: 15937–15940.
- Fukushima, T., Furihata, I., Emmins, R., Daniel, R.A., Hoch, J.A., and Szurmant, H. (2011) A role for the essential YycG sensor histidine kinase in sensing cell division. *Molecular Microbiology*, **79**: 503–522.

- Fukushima, T., Szurmant, H., Kim, E.-J., Perego, M., and Hoch, J.A. (2008) A sensor histidine kinase co-ordinates cell wall architecture with cell division in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **69**: 621–632.
- Gao, R., and Stock, A.M. (2009) Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual Review of Microbiology*, **63**: 133–154.
- Gebhard, S., and Mascher, T. (2011) Antimicrobial peptide sensing and detoxification modules: unravelling the regulatory circuitry of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, **81**: 581–587.
- Gerharz, T., Reinelt, S., Kaspar, S., Scapozza, L., and Bott, M. (2003) Identification of basic amino acid residues important for citrate binding by the periplasmic receptor domain of the sensor kinase CitA. *Biochemistry*, **42**: 5917–5924
- Golby, P., Davies, S., Kelly, D.J., Guest, J.R., and Andrews, S.C. (1999) Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C₄-dicarboxylates in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **181**: 1238–1248.
- Golby, P., Kelly, D.J., Guest, J.R., and Andrews, S.C. (1998) Transcriptional regulation and organization of the *dcuA* and *dcuB* genes, encoding homologous anaerobic C₄-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **180**: 6586–6596.
- Goodsell, D.S. (1991) Inside a living cell. *Trends Biochem Sci.*, **16**: 203–206.
- Graf, S., Schmieden, D., Tschauener, K., Hunke, S., and Unden G. (2014) The sensor kinase DctS forms a tripartite sensor unit with DctB and DctA for sensing C₄-dicarboxylates in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **196**: 1084–1093.
- Graf, S. (2009) Der Fumaratsensor DcuS aus *Geobacillus kaustophilus*. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Gratkowski, H., Lear, J.D., and DeGrado, W.F. (2001) Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**: 880–885.
- Griffith, K.L., and Wolf, R.E. (2002) Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochem Biophys Res Commun*, **290**: 397–402.
- Groeneveld, M., and Slotboom, D.J. (2010) Na⁺:aspartate coupling stoichiometry in the glutamate transporter homologue Glt_{ph}. *Biochemistry*, **49**: 3511–3513.
- Guest, J.R., Roberts R. E., and Wilde, R.J. (1984) Cloning of the aspartase gene (*aspA*) of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.*, **130**: 1271–1278.
- Guest J. R. (1979) Anaerobic growth of *Escherichia coli* K12 with fumarate as terminal electron acceptor. Genetic studies with menaquinone and fluoroacetate-resistant mutants. *J Gen Microbiol.*, **115**: 259–271.
- Gurezka, R., Laage, R., Brosig, B., and Langosch, D. (1999) A Heptad Motif of Leucine Residues Found in Membrane Proteins Can Drive Self-assembly of Artificial Transmembrane Segments. *Journal of Biological Chemistry*, **274**: 9265–9270.
- Gutowski, S.J., and Rosenberg, H. (1975) Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K12. *Biochem J.*, **152**: 647–654.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology*, **177**: 4121–4130.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**: 557–580.

- Huang, Z., and Tajkhorshid, E. (2010) Identification of the Third Na⁺ Site and the Sequence of Extracellular Binding Events in the Glutamate Transporter. *Biophysical Journal*, **99**: 1416–1425.
- Island, M., and Kadner, R. (1993) Interplay between the Membrane-Associated UhpB and UhpC Regulatory Proteins. *Journal of Bacteriology*, **175**: 5028–5034.
- Janausch, I.G., Garcia-Moreno, I., Lehnen, D., Zeuner, Y., and Unden, G. (2004) Phosphorylation and DNA binding of the regulator DcuR of the fumarate-responsive two-component system DcuSR of *Escherichia coli*. *Microbiology*, **150**: 877–883.
- Janausch, I., Zientz, E., Tran, Q., Kröger, A., and Unden, G. (2002a) C₄-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1553**: 39–56.
- Janausch, I.G., Garcia-Moreno, I., and Unden, G. (2002b) Function of DcuS from *Escherichia coli* as a Fumarate-stimulated Histidine Protein Kinase *in Vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 39809–39814.
- Janausch, I., Kim, O., and Unden, G. (2001) DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*. Contribution of diffusion and of alternative carriers. *Archives of Microbiology*, **176**: 224–230.
- Jardetzky, O. (1966) Simple Allosteric Model for Membrane Pumps. *Nature*, **211**: 969–70.
- Jensen, K.F. (1993) The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *Journal of Bacteriology*, **175**: 3401–3407.
- Kadner, R., Island, M., Dahl, J., and Webber, C. (1994) A transmembrane signalling complex controls transcription of the Uhp sugar phosphate transport system. *Research in Microbiology*, **145**: 381–387.
- Kallenberg, F., Dintner, S., Schmitz, R., and Gebhard, S. (2013) Identification of Regions Important for Resistance and Signalling within the Antimicrobial Peptide Transporter BceAB of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **195**: 3287–3297.
- Karimova, G., Dautin, N., and Ladant, D. (2005) Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *Journal of Bacteriology*, **187**: 2233–2243.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**: 5752–5756.
- Karinou, E., Compton, E.L.R., Morel, M., and Javelle, A. (2013) The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C₄-dicarboxylic acid transporter. *Molecular Microbiology*, **87**: 623–640.
- Kay, W., and Kornberg, H. (1969) Genetic control of the uptake of C₄-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, **3**: 93–96.
- Kay, W., and Kornberg, H. (1971) The Uptake of C₄-Dicarboxylic Acids by *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, **18**: 274–281.
- Kentner, D., Thiem, S., Hildenbeutel, M., and Sourjik, V. (2006) Determinants of chemoreceptor cluster formation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **61**: 407–417.
- Kim, O.B., Lux, S., and Unden, G. (2007) Anaerobic growth of *Escherichia coli* on d-tartrate depends on the fumarate carrier DcuB and fumarase, rather than the l-tartrate carrier TtdT and l-tartrate dehydratase. *Archives of Microbiology*, **188**: 583–589.
- Kleefeld, A. (2002) Der Einfluss der C₄-Dicarboxylat-Carrier DcuB und DctA auf die DcuSR-abhängige Genregulation in *Escherichia coli*. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.

- Kleefeld, A., Ackermann, B., Bauer, J., Kramer, J., and Unden, G. (2009) The Fumarate/Succinate Antiporter DcuB of *Escherichia coli* Is a Bifunctional Protein with Sites for Regulation of DcuS-dependent Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, **284**: 265–275.
- Kleiger, G., Grothe, R., Mallick, P., and Eisenberg, D. (2002) GXXXG and AXXXA: Common α -Helical Interaction Motifs in Proteins, Particularly in Extremophiles †. *Biochemistry*, **41**: 5990–5997.
- Kneuper, H., Janausch, I.G., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Bock, V., Griesinger, C., and Unden, G. (2005) The Nature of the Stimulus and of the Fumarate Binding Site of the Fumarate Sensor DcuS of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **280**: 20596–20603.
- Kneuper, H., Scheu, P.D., Etkorn, M., Sevvana, M., Dünwald, P., Becker, S., Baldus, M., Griesinger, C., and Unden, G. (2010) Sensing ligands by periplasmic sensing histidine kinases with sensory PAS domains. In *Sensory mechanisms in bacteria: Molecular aspects of signal recognition*. Spiro, S., and Dixon, R. (eds). Norfolk UK: Caister Academic Press 39–59.
- Krämer, J., Fischer, J.D., Zientz, E., Vijayan, V., Griesinger, C., Lupas, A., and Unden, G. (2007) Citrate Sensing by the C₄-Dicarboxylate/Citrate Sensor Kinase DcuS of *Escherichia coli*: Binding Site and Conversion of DcuS to a C₄-Dicarboxylate- or Citrate-Specific Sensor. *Journal of Bacteriology*, **189**: 4290–4298.
- Langosch, D., Brosig, B., Kolmar, H., and Fritz H. (1996) Dimerisation of the Glycophorin A Transmembrane Segment in Membranes Probed with the ToxR Transcription Activator. *Journal of Molecular Biology*, **263**: 525–530.
- Langosch, D., and Heringa J. (1998) Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils. *Proteins*, **31**: 150–159.
- Langosch, D., and Arkin, I.T. (2009) Interaction and conformational dynamics of membrane-spanning protein helices. *Protein Science*, **18**: 1343–1358.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**: 2947–2948.
- Lau, T.-L., Kim, C., Ginsberg, M.H., and Ulmer, T.S. (2009) The structure of the integrin α IIb β 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *The EMBO Journal*, **28**: 1351–1361.
- Lemmon, M.A., Flanagan, J.M., Treutlein, H.R., Zhang, J., and Engelman, D.M. (1992a) Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices. *Biochemistry*, **31**: 12719–12725.
- Lemmon, M.A., Flanagan, J.M., Hunt, J.F., Adair, B.D., Bormann, B.J., Dempsey, C.E., and Engelman D.M. (1992b) Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices. *Journal of Biological Chemistry*, **267**: 7683–7689.
- Lemmon, M.A., Treutlein, H.R., Adams, P.D., Brünger, A.T., and Engelman D.M. (1994) A dimerization motif for transmembrane alpha-helices. *Nat Struct Biol.*, **1**: 157–163.
- Lemmon, M.A., and Engelman, D.M. (1992) Helix-helix interactions inside lipid bilayers. *Current Opinion in Structural Biology*, **2**: 511–518.
- Lenn, T., Leake, M.C., and Mullineaux, C.W. (2008) Are *Escherichia coli* OXPHOS complexes concentrated in specialized zones within the plasma membrane? *Biochemical Society Transactions*, **36**: 1032.
- Li, E., Wimley, W.C., and Hristova, K. (2012) Transmembrane helix dimerization: Beyond the search for sequence motifs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1818**: 183–193.

- Liu, J., and Rost, B. (2001) Comparing function and structure between entire proteomes. *Protein Science*, **10**: 1970–1979.
- Lo, T.C., Rayman, M.K., and Sanwal, B.D. (1972) Transport of succinate in *Escherichia coli*. I. Biochemical and genetic studies of transport in whole cells. *Journal of Biological Chemistry*, **247**: 6323–6331.
- Mackenzie, K., Prestegard, J., and Engelman D.M. (1997) A Transmembrane Helix Dimer: Structure and Implications. *Science*, **276**: 131–133.
- Maier, K.S., Hubich, S., Liebhart, H., Krauss, S., Kuhn, A., and Facey, S.J. (2008) An amphiphilic region in the cytoplasmic domain of KdpD is recognized by the signal recognition particle and targeted to the *Escherichia coli* membrane. *Molecular Microbiology*, **68**: 1471–1484.
- Maloney, P.C., Kashket, E.R., and Wilson, T.H. (1974) A Protonmotive Force Drives ATP Synthesis in Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **71**: 3896–3900.
- Marina, A., Waldburger, C.D., and Hendrickson, W.A. (2005) Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *The EMBO Journal*, **24**: 4247–4259.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Unden, G. (2006) Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **70**: 910–938.
- Meile, J.-C., Wu, L.J., Ehrlich, S.D., Errington, J., and Noirot, P. (2006) Systematic localisation of proteins fused to the green fluorescent protein in *Bacillus subtilis*: Identification of new proteins at the DNA replication factory. *PROTEOMICS*, **6**: 2135–2146.
- Melnyk, R.A., Kim, S., Curran, A.R., Engelman, D.M., Bowie, J.U., and Deber, C.M. (2004) The Affinity of GXXXG Motifs in Transmembrane Helix-Helix Interactions Is Modulated by Long-range Communication. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 16591–16597.
- Meyer, F.M., Gerwig, J., Hammer, E., Herzberg, C., Commichau, F.M., Völker, U., and Stülke, J. (2011) Physical interactions between tricarboxylic acid cycle enzymes in *Bacillus subtilis*: Evidence for a metabolon. *Metabolic Engineering*, **13**: 18–27.
- Miller, J.H. (1992) A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Mineev, K.S., Bocharov, E.V., Volynsky, P.E., Goncharuk, M.V., Tkach, E.N., Ermolyuk, Y.S., Schulga, A.A., Chupin, V.V., Maslennikov, I.V., Efremov, R.G., and Arseniev, A.S. (2011a) Dimeric structure of the transmembrane domain of glycophorin a in lipidic and detergent environments. *Acta Naturae*, **3**: 90–98.
- Mineev, K., Khabibullina, N., Lyukmanova, E., Dolgikh, D., Kirpichnikov, M., and Arseniev, A. (2011b) Spatial structure and dimer–monomer equilibrium of the ErbB3 transmembrane domain in DPC micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1808**: 2081–2088.
- Mineev, K.S., Bocharov, E.V., Pustovalova, Y.E., Bocharova, O.V., Chupin, V.V., and Arseniev, A.S. (2010) Spatial Structure of the Transmembrane Domain Heterodimer of ErbB1 and ErbB2 Receptor Tyrosine Kinases. *Journal of Molecular Biology*, **400**: 231–243.
- Miroux, B., and Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, **260**: 289–298.
- Monzel, C., Degreif-Dünnwald, P., Gröpper, C., Griesinger, C., and Unden, G. (2013) The cytoplasmic PAS_C domain of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*. Role in signal transduction, dimer formation, and DctA interaction. *MicrobiologyOpen*, **2**: 912–927.
- Moraes, T.F., and Reithmeier, R.A. (2012) Membrane transport metabolons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1818**: 2687–2706.

- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., and Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, **51**: 263–273.
- Neiditch, M.B., Federle, M.J., Pompeani, A.J., Kelly, R.C., Swem, D.L., Jeffrey, P.D., Bassler, B.L., and Hughson, F.M. (2006) Ligand-Induced Asymmetry in Histidine Sensor Kinase Complex Regulates Quorum Sensing. *Cell*, **126**: 1095–1108.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, **273**: 1392–1395.
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B.L., Mori, H., and Mizuno, T. (2002) Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, **46**: 281–291.
- Pappalardo, L., Janausch, I.G., Vijayan, V., Zientz, E., Junker, J., Peti, W., Zweckstetter, M., Uden, G., and Griesinger C. (2003) The NMR Structure of the Sensory Domain of the Membranous Two-component Fumarate Sensor (Histidine Protein Kinase) DcuS of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 39185–39188.
- Paul, R., Jaeger, T., Abel, S., Wiederkehr, I., Folcher, M., Biondi, E.G., Laub, M.T., and Jenal, U. (2008) Allosteric Regulation of Histidine Kinases by Their Cognate Response Regulator Determines Cell Fate. *Cell*, **133**: 452–461.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, **25**: 1605–1612.
- Pos, K.M., Dimroth, P., and Bott, M. (1998) The *Escherichia coli* citrate carrier CitT: a member of a novel eubacterial transporter family related to the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts. *Journal of Bacteriology*, **180**: 4160–4165.
- Qin, L., Dutta, R., Kurokawa, H., Ikura, M., and Inouye, M. (2000) A monomeric histidine kinase derived from EnvZ, an *Escherichia coli* osmosensor. *Molecular Microbiology*, **36**: 24–32.
- Rauschmeier, M., Schüppel, V., Tetsch, L., and Jung, K. (2014) New Insights into the Interplay Between the Lysine Transporter LysP and the pH Sensor CadC in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, **426**: 215–229.
- Reyes, N., Ginter, C., and Boudker, O. (2009) Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature*, **462**: 880–885.
- Rietkötter, E., Hoyer, D., and Mascher, T. (2008) Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **68**: 768–785.
- Ruan, W., Becker, V., Klingmüller, U., and Langosch, D. (2004) The Interface between Self-assembling Erythropoietin Receptor Transmembrane Segments Corresponds to a Membrane-spanning Leucine Zipper. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 3273–3279.
- Rudner, D.Z., and Losick, R. (2010) Protein Subcellular Localization in Bacteria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**: a000307.
- Russ, W.P., and Engelman, D.M. (1999) TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 863–868.
- Russ, W., and Engelman, D.M. (2000) The GxxxG Motif: A Framework for Transmembrane Helix-Helix Association. *Journal of Molecular Biology*, **296**: 911–919.
- Sal-Man, N., Gerber, D., and Shai, Y. (2004) The Composition Rather than Position of Polar Residues (QxxS) Drives Aspartate Receptor Transmembrane Domain Dimerization *in Vivo*. *Biochemistry*, **43**: 2309–2313.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001) Molecular cloning: A Laboratory Manual (Third Edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.

- Scheu, P.D., Liao, Y.-F., Bauer, J., Kneuper, H., Basche, T., Unden, G., and Erker, W. (2010a) Oligomeric Sensor Kinase DcuS in the Membrane of *Escherichia coli* and in Proteoliposomes: Chemical Cross-linking and FRET Spectroscopy. *Journal of Bacteriology*, **192**: 3474–3483.
- Scheu, P., Sdorra, S., Liao, Y.-F., Wegner, M., Basche, T., Unden, G., and Erker, W. (2008) Polar accumulation of the metabolic sensory histidine kinases DcuS and CitA in *Escherichia coli*. *Microbiology*, **154**: 2463–2472.
- Scheu, P.D., Witan, J., Rauschmeier, M., Graf, S., Liao, Y.-F., Ebert-Jung, A., Basche, T., Erker, W., and Unden, G. (2012) CitA/CitB Two-Component System Regulating Citrate Fermentation in *Escherichia coli* and Its Relation to the DcuS/DcuR System *In Vivo*. *Journal of Bacteriology*, **194**: 636–645.
- Scheu, P.D. (2009) Oligomerisation, Localisation and Interaction of the sensor histidine kinases DcuS and CitA in *Escherichia coli*. *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Scheu, P.D., Kim, O.B., Griesinger, C., and Unden, G. (2010b) Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: exogenous versus endogenous sensing of C₄-dicarboxylates in bacteria. *Future Microbiology*, **5**: 1383–1402.
- Schneider, D., and Engelman, D.M. (2003) GALLEX, a Measurement of Heterologous Association of Transmembrane Helices in a Biological Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 3105–3111.
- Schneider, D., and Engelman, D.M. (2004) Motifs of Two Small Residues can Assist but are not Sufficient to Mediate Transmembrane Helix Interactions. *Journal of Molecular Biology*, **343**: 799–804.
- Schwöppe, C., Winkler, H.H., and Neuhaus, H.E. (2003) Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, **270**: 1450–1457.
- Sciara, M.I., Spagnuolo, C., Jares-Erijman, E., and García Véscovi, E. (2008) Cytolocalization of the PhoP response regulator in *Salmonella enterica*. Modulation by extracellular Mg²⁺ and by the SCV environment. *Molecular Microbiology*, **70**: 479–493.
- Senes, A., Gerstein, M., and Engelman, D.M. (2000) Statistical Analysis of Amino Acid Patterns in Transmembrane Helices: The GxxxG Motif Occurs Frequently and in Association with β -branched Residues at Neighboring Positions. *Journal of Molecular Biology*, **296**: 921–936.
- Senes, A., Ubarretxena-Belandia, I., and Engelman, D.M. (2001) The C α —OH...O hydrogen bond: A determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**: 9056–9061.
- Sevvana, M., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Reinelt, S., Madden, D.R., Herbst-Irmer, R., Sheldrick, G.M., Bott, M., Griesinger, C., and Becker, S. (2008) A Ligand-Induced Switch in the Periplasmic Domain of Sensor Histidine Kinase CitA. *Journal of Molecular Biology*, **377**: 512–523.
- Shapiro, L., McAdams, H.H., and Losick, R. (2009) Why and How Bacteria Localize Proteins. *Science*, **326**: 1225–1228.
- Shapiro, L., McAdams, H.H., and Losick, R. (2002) Generating and Exploiting Polarity in Bacteria. *Science*, **298**: 1942–1946.
- Shrivastava, I.H., Jiang, J., Amara, S.G., and Bahar, I. (2008) Time-resolved Mechanism of Extracellular Gate Opening and Substrate Binding in a Glutamate Transporter. *Journal of Biological Chemistry*, **283**: 28680–28690.
- Silhavy, T., Berman, M., and Enquist, L. (1984) Experiments with Gene Fusions. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.

- Six, S., Andrews, S.C., Unden, G., and Guest, J.R. (1994) *Escherichia coli* Possesses Two Homologous Anaerobic C₄-Dicarboxylate Membrane Transporters (DcuA and DcuB) Distinct from the Aerobic Dicarboxylate Transport System (Dct). *Journal of Bacteriology*, **176**: 6470–6478.
- Smith, S.O., Song, D., Shekar, S., Groesbeek, M., Ziliox, M., and Aimoto, S. (2001) Structure of the Transmembrane Dimer Interface of Glycophorin A in Membrane Bilayers †. *Biochemistry*, **40**: 6553–6558.
- Sommer, E., Koler, M., Frank, V., Sourjik, V., Vaknin, A., and Rao, C.V. (2013) The Sensory Histidine Kinases TorS and EvgS Tend to Form Clusters in *Escherichia coli* Cells. *PLoS ONE*, **8**: e77708.
- Sourjik, V., and Berg, H.C. (2000) Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions. *Molecular Microbiology*, **37**: 740–751.
- Sousa, P.M., Silva, S.T., Hood, B.L., Charro, N., Carita, J.N., Vaz, F., Penque, D., Conrads, T.P., and Melo, A.M.P. (2011) Supramolecular organizations in the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Biochimie*, **93**: 418–425.
- Steinmetz, P.A. (2010) Die Transmembrandomäne des C₄-Dicarboxylat-Sensors DcuS aus *Escherichia coli*. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Stevens, T.J., and Arkin, I.T. (2001) Substitution rates in alpha-helical transmembrane proteins. *Protein Science*, **10**: 2507–2517.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.*, **69**: 183–215.
- Tamm, L.K., Hong, H., and Liang, B. (2004) Folding and assembly of β -barrel membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1666**: 250–263.
- Teichman, S., and Kanner, B.I. (2007) Aspartate-444 Is Essential for Productive Substrate Interactions in a Neuronal Glutamate Transporter. *The Journal of General Physiology*, **129**: 527–539.
- Tetsch, L., Koller, C., Haneburger, I., and Jung, K. (2008) The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Molecular Microbiology*, **67**: 570–583.
- Tetsch, L., and Jung, K. (2009) The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Molecular Microbiology*, **73**: 982–991.
- Thiem, S., and Sourjik, V. (2008) Stochastic assembly of chemoreceptor clusters in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **68**: 1228–1236.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**: 4350–4354.
- Treptow N. A., and 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. *Journal of Bacteriology*, **163**: 654–660.
- Ulmschneider, M.B., and Sansom, M.S. (2001) Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1512**: 1–14.
- Unden, G., and Kleefeld, A. (2004) C₄-Dicarboxylate Degradation in Aerobic and Anaerobic Growth. In R. Curtiss III, *EcoSal - Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. [Online] <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, D.C.
- Verdon, G., Oh, S., Serio, R.N., and Boudker, O. (2014) Coupled ion binding and structural transitions along the transport cycle of glutamate transporters. 10.7554/eLife.02283

- Wallace, B.J., and Young, I.G. (1977) Aerobic respiration in mutants of *Escherichia coli* accumulating quinone analogues of ubiquinone. *Biochim Biophys Acta.*, **461**: 75–83.
- Wallin, E., and Heijne, G. von (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **7**: 1029–1038.
- Walther, D., Eisenheimer, F., and Argos, P. (1996) Principles of helix-helix packing in proteins: the helical lattice superposition model. *Journal of Molecular Biology*, **255**: 536–553.
- West, A.H., and Stock, A.M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**: 369–376.
- Weston, L.A., and Kadner R. J. (1987) Identification of Uhp Polypeptides and Evidence for Their Role in Exogenous Induction of the Sugar Phosphate Transport System of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, **169**: 3546–3555.
- Witan, J. (2012) Funktion der C₄-Dicarboxylat-Transporter DctA und DcuB als Co-Sensoren von DcuS in *Escherichia coli*. *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Witan, J., Bauer, J., Wittig, I., Steinmetz, P.A., Erker, W., and Unden, G. (2012) Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Molecular Microbiology*, **85**: 846–861.
- Witan, J., Monzel, C., Scheu, P.D., and Unden, G. (2012) The sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: two stimulus input sites and a merged signal pathway in the DctA/DcuS sensor unit. *Biological Chemistry*, **393**.
- Wörner, S. (2013) Substratspezifität des Sensors DcuS und der Transporter DcuB und DctA. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Xu, D., and Zhang, Y. (2012) *Ab initio* protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins*, **80**: 1715–1735.
- Yang J., Ma, J., Page, R.C., Misra, S., Plow, E.F., and Qin, J. (2009) Structure of an integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ transmembrane-cytoplasmic heterocomplex provides insight into integrin activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 17729–17734.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**: 103–119.
- Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y., and Gouaux, E. (2004) Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature*: 811–818.
- Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., and Tsien, R.Y. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, **296**: 913–916.
- Zhou, F.X., Merianos, H.J., Brunger, A.T., and Engelman, D.M. (2001) Polar residues drive association of poly-leucine transmembrane helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**: 2250–2255.
- Zientz, E., Bongaerts, J., and Unden G. (1998) Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR* genes) two-component regulatory system. *Journal of Bacteriology*, **180**: 5421–5425.
- Zientz, E., Janausch, I.G., Six, S., and Unden, G. (1999) Functioning of DcuC as the C₄-Dicarboxylate Carrier during Glucose Fermentation by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **181**: 3716–3720.
- Zientz, E., Six, S., and Unden, G. (1996) Identification of a Third Secondary Carrier (DcuC) for Anaerobic C₄-Dicarboxylate Transport in *Escherichia coli*: Roles of the Three Dcu Carriers in Uptake and Exchange. *Journal of Bacteriology*, **178**: 7241–7247.

7 Anhang

Tab. A1: Liste der verwendeten Substanzen

Chemikalie	Hersteller
[2,3- ¹⁴ C]-Fumarat	Hartmann Analytics
[2,3- ¹⁴ C]-Succinat	Moravec Biochemicals
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Fluka
2-Mercaptoethanol	Roth
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth
3-Nitropropionsäure	Sigma-Aldrich
4-Chloronaphthol	Sigma-Aldrich
4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranosid (MUG)	Sigma-Aldrich
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich
Acrylamid-Mix	Roth
Agar-Agar, Kobe 1	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Bacto-Trypton	Becton, Dickson and Company
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	Roth
Bromphenolblau	Janssen Chimica
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth
Casein, Säurehydrolysat	Gibco
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Serva
Chloramphenicol	Fluka
Chloroform	Roth
Coomassie brilliant blue	Serva
D-Glucose-Monohydrat	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
di-Natriumfumarat	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ (2xH ₂ O))	Roth
di-Natriumsuccinat	Roth
D-Maltose	Fluka
dNTP Mix	Thermo Scientific
D-Saccharose	Roth
Eisessig	Roth
Ethanol	Merck
Ethanol (vergällt)	VWR

Chemikalie	Hersteller
Glycerin (86%)	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Serva (Servabacter)
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Scientific
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth
Kanamycinsulfat	Roth
L-Arabinose	Merck
L-Aspartat	Fluka
LB-Medium (Lennox)	Roth
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth
L-Malat, Dinatriumsalz	Sigma
L-Tryptophan	Serva
Magermilchpulver	Fluka
Magnesiumchlorid Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka
Magnesiumsulfat Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	Roth
Maleinsäure	Fluka
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Fluka
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG)	Sigma-Aldrich
Pepton aus Casein	Roth
Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000)	Roth
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Roth
Ponceau S	Roth
Rotiszint eco plus	Roth
Spectinomycin	Sigma
Super optimal Browth (SOB)	Roth
Tetracyclin	Fluka
Trichloressigsäure	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth
Wasserstoffperoxid (H_2O_2), 30 %	Fluka

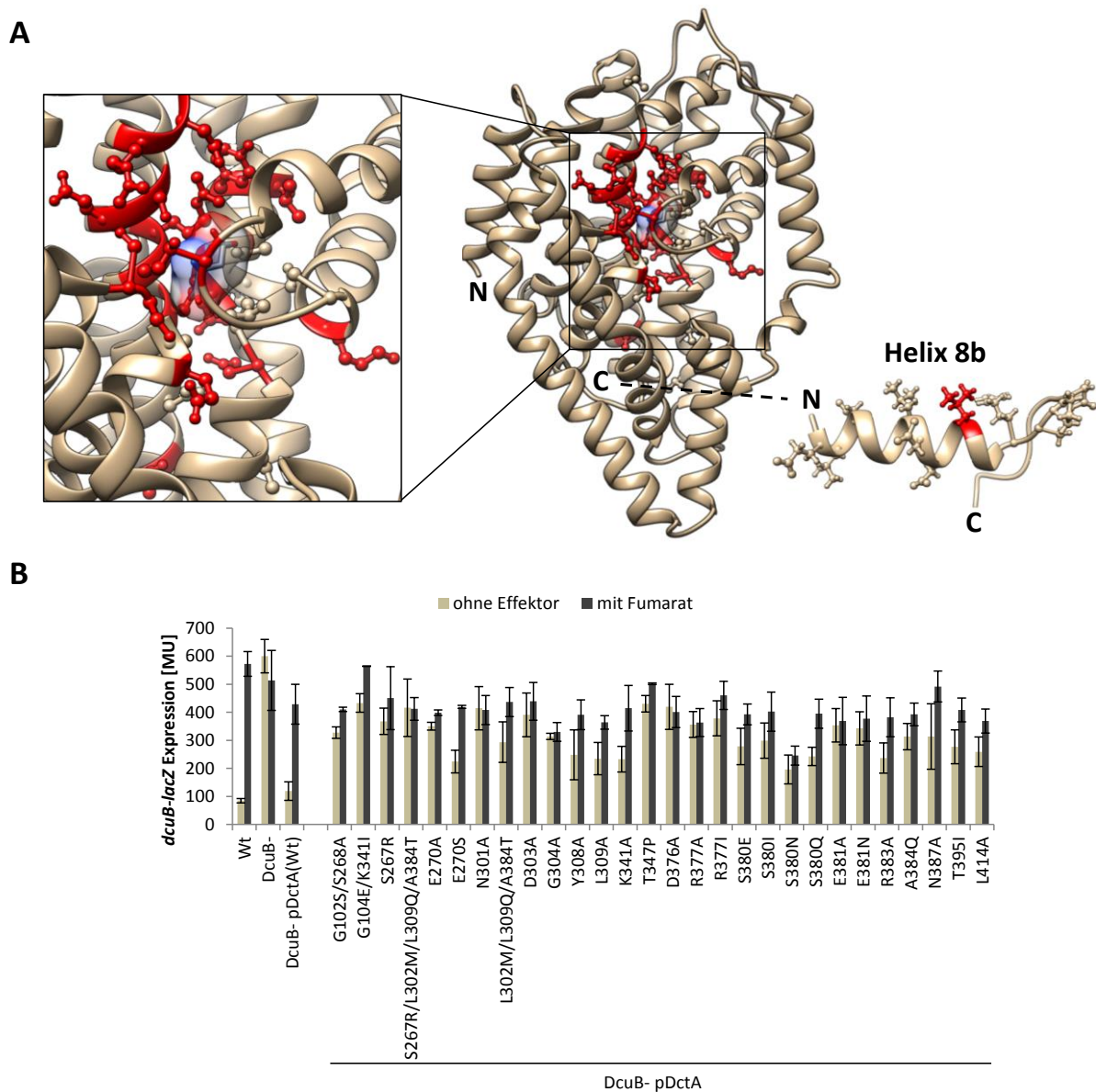


Abb. A1: Regulatorisch-defiziente Varianten von DctA. (A) Lage der regulatorisch-defizienten Varianten (rot) im DctA Strukturmodell. Alle substituierten Aminosäurereste sind dargestellt. Die vermeintliche Bindetasche von DctA ist hervorgehoben (schwarzer Kasten). (B) Messung der regulatorischen Funktion der DctA-Varianten. Der DcuB-defiziente Stamm IMW503 (DcuB-) wurde mit Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μ M L-Arabinose induziert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die *dcuB-lacZ* Expression der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige Balken). 20 mM Fumarat wurde als Effektor benutzt (dunkelgraue Balken). Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Wt: IMW237; DcuB-: IMW503; pDctA(Wt): pMW1194; pDctA(G102S/S268A): pMW2089; pDctA(G104E/K341I): pMW2090; pDctA(S267R): pMW1879; pDctA(S267R/L302M/L309Q/A384T): pMW1948; pDctA(E270A): pMW2091; pDctA(E270S): pMW2086; pDctA(N301A): pMW1945; pDctA(L302M/L309Q/A384T): pMW1952; pDctA(D303A): pMW1859; pDctA(G304A): pMW2082; pDctA(Y308A): pMW2029; pDctA(L309A): pMW1860; pDctA(K341A): pMW1863; pDctA(T347P): pMW2083; pDctA(D376A): pMW1864; pDctA(R377A): pMW1865; pDctA(R377I): pMW2151; pDctA(S380E): pMW2157; pDctA(S380I): pMW1867; pDctA(S380N): pMW2159; pDctA(S380Q): pMW2158; pDctA(E381A): pMW1869; pDctA(E381N): pMW2160; pDctA(R383A): pMW1881; pDctA(A384Q): pMW1870; pDctA(N387A): pMW1947; pDctA(T395I): pMW2162; pDctA(L414A): pMW1271

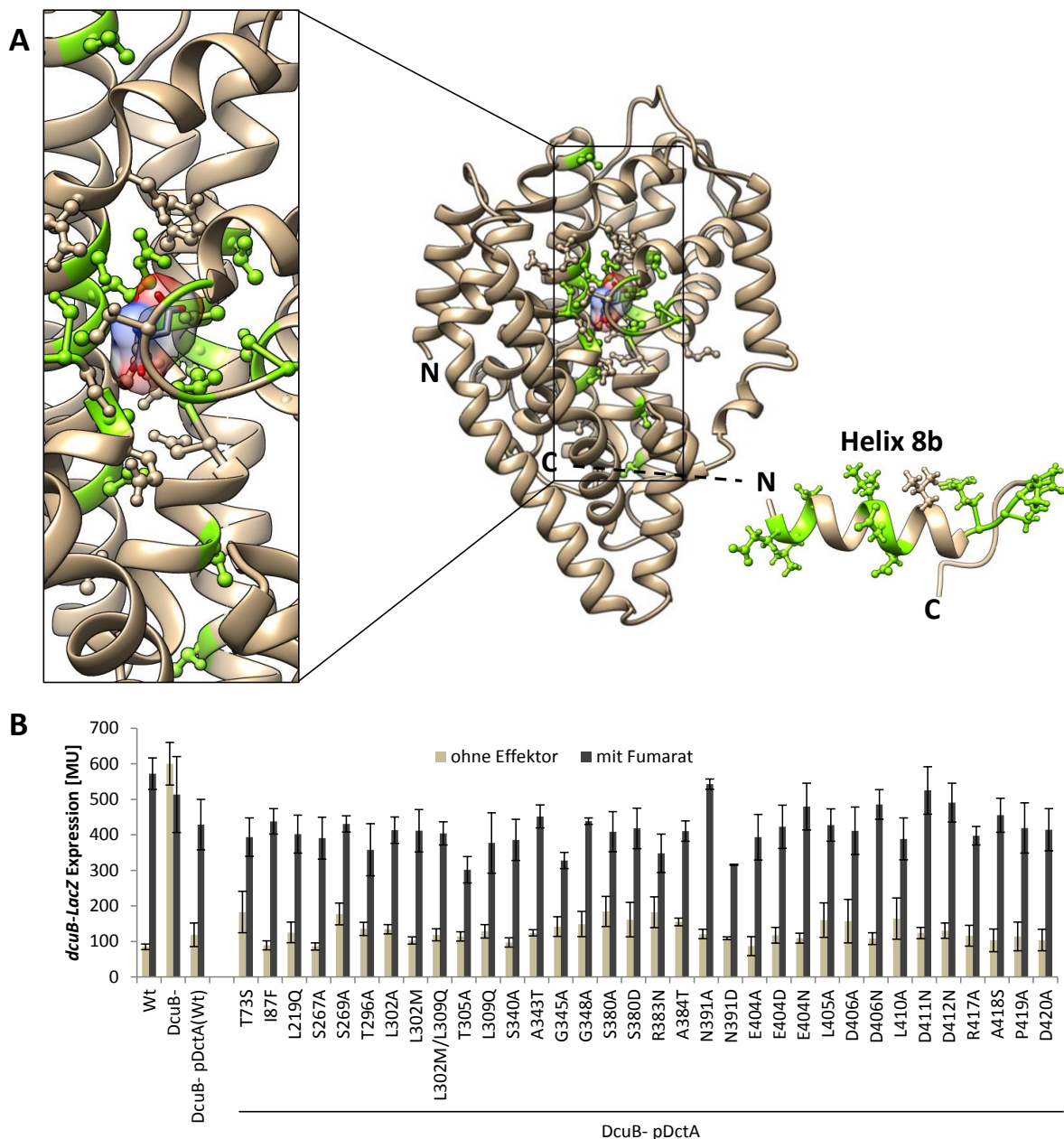


Abb. A2: Regulatorisch-aktive Varianten von DctA. (A) Lage der regulatorisch-aktiven Varianten (grün) im DctA Strukturmodell. Alle substituierten Aminosäurereste sind dargestellt. Die vermeintliche Bindetasche von DctA ist hervorgehoben (schwarzer Kasten). (B) Messung der regulatorischen Funktion der DctA-Varianten. Der DcuB-defiziente Stamm IMW503 (DcuB-) wurde mit Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μ M L-Arabinose induziert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die *dcuB-lacZ* Expression der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige Balken). 20 mM Fumarat wurde als Effektor benutzt (dunkelgraue Balken). Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Wt: IMW237; DcuB-: IMW503; pDctA(Wt): pMW1194; pDctA(T73S): pMW2025; pDctA(I87F): pMW2026; pDctA(L219Q): pMW2027; pDctA(S267A): pMW1878; pDctA(S269A): pMW1944; pDctA(T296A): pMW1880; pDctA(L302A): pMW1857; pDctA(L302M): pMW1858; pDctA(L302M/L309Q): pMW1882; pDctA(T305A): pMW1946; pDctA(L309Q): pMW1861; pDctA(S340A): pMW1862; pDctA(A343T): pMW2081; pDctA(G345A): pMW2087; pDctA(G348A): pMW2085; pDctA(S380A): pMW1866; pDctA(S380D): pMW1868; pDctA(R383N): pMW2161; pDctA(A384T): pMW1871; pDctA(N391A): pMW2084; pDctA(N391D): pMW2088; pDctA(E404A): pMW1484; pDctA(E404D): pMW2028; pDctA(E404N): pMW2152; pDctA(L405A): pMW1485; pDctA(D406A): pMW1476; pDctA(D406N): pMW2153; pDctA(L410A): pMW1477; pDctA(D411N): pMW2154; pDctA(D412N): pMW2155; pDctA(R417A): pMW1274; pDctA(A418S): pMW1275; pDctA(P419A): pMW1276; pDctA(D420A): pMW1277

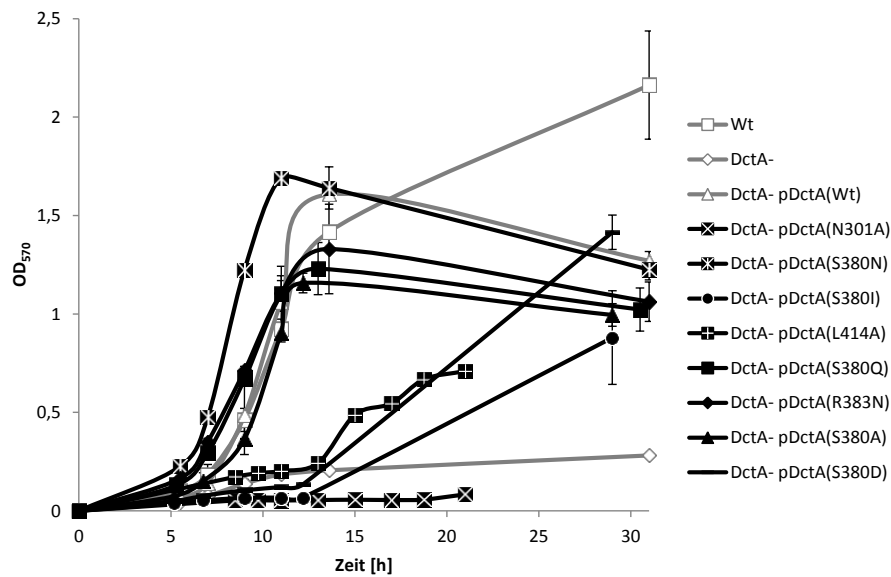
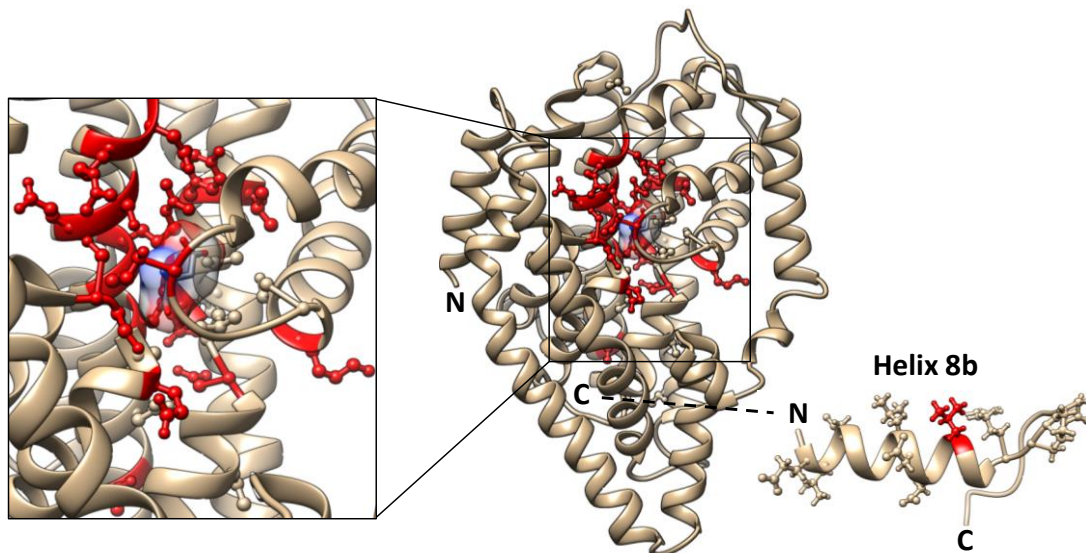


Abb. A3: Wachstumstests der DctA-Varianten. Der DctA-defiziente Stamm MDO800 (DctA-) wurde mit den Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in eM9-Medium mit 50 mM Fumarat als Wachstumssubstrat. Die optische Dichte OD_{570nm} der Kulturen wurde nach regelmäßigen Abständen bestimmt. Als Positivkontrolle diente *E. coli* Stamm AN387 (Wt). Wt: AN387; DctA-: MDO800; pDctA(Wt): pMW1194; pDctA(N301A): pMW1945; pDctA(S380A): pMW1866; pDctA(S380D): pMW1868; pDctA(S380I): pMW1867; pDctA(S380N): pMW2159; pDctA(S380Q): pMW2158; pDctA(R383N): pMW2161; pDctA(L414A): pMW1271

A



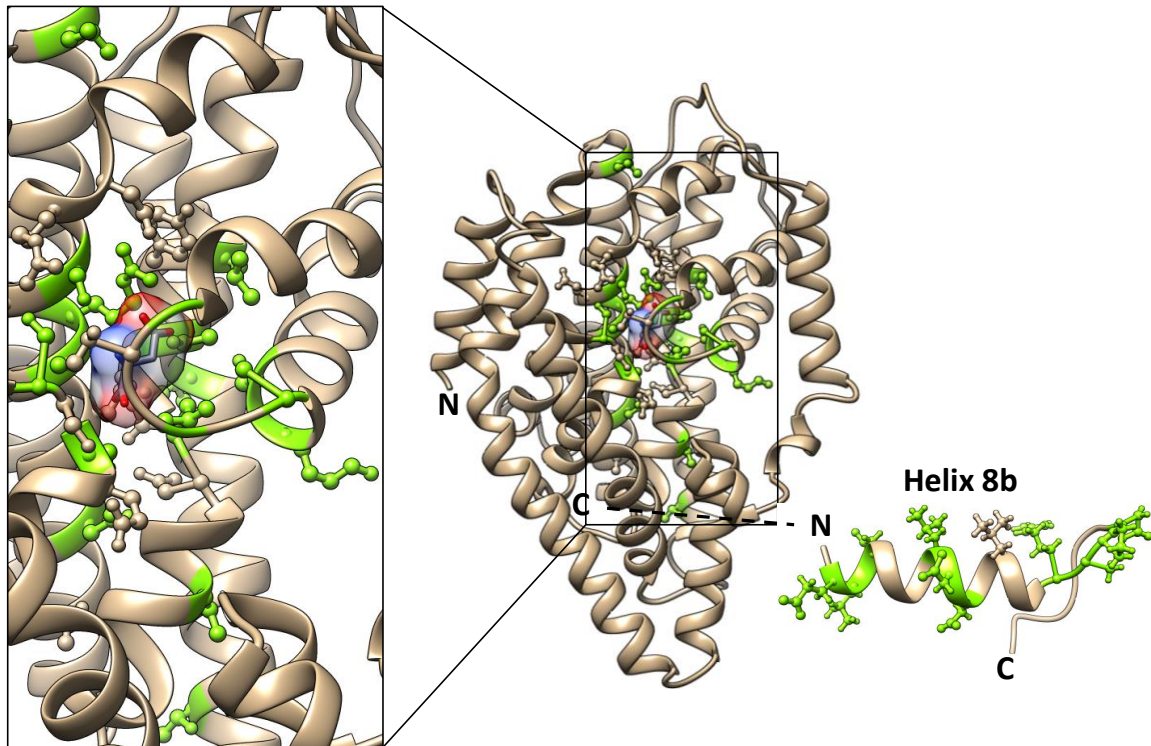
B

DctA Varianten												
G102S/ S268A	G104E/ K341I	S267R	S267R/ L302M/ L309Q/ A384T	E270A	E270S	N301A	L302M/ L309Q/ A384T	D303A	G304A	Y308A	L309A	T347P
D376A	R377A	R377I	S380D	S380E	S380I	E381A	E381N	R383A	A384Q	N387A	T395I	L414A

Abb. A4: DctA-Varianten mit eingeschränktem Wachstum. (A) Lage der Varianten mit eingeschränktem Wachstum (rot) im DctA Strukturmodell. Alle substituierten Aminosäurereste sind dargestellt. Die vermeintliche Bindetasche von DctA ist hervorgehoben (schwarzer Kasten). (B) Liste der DctA-Varianten mit eingeschränktem Wachstum. pDctA(G102S/S268A): pMW2089; pDctA(G104E/K341I): pMW2090;

pDctA(S267R): pMW1879; pDctA(S267R/L302M/L309Q/A384T): pMW1948; pDctA(E270A): pMW2091; pDctA(E270S): pMW2086; pDctA(N301A): pMW1945; pDctA(L302M/L309Q/A384T): pMW1952; pDctA(D303A): pMW1859; pDctA(G304A): pMW2082; pDctA(Y308A): pMW2029; pDctA(L309A): pMW1860; pDctA(T347P): pMW2083; pDctA(D376A): pMW1864; pDctA(R377A): pMW1865; pDctA(R377I): pMW2151; pDctA(S380D): pMW1868; pDctA(S380E): pMW2157; pDctA(S380I): pMW1867; pDctA(E381A): pMW1869; pDctA(E381N): pMW2160; pDctA(R383A): pMW1881; pDctA(A384Q): pMW1870; pDctA(N387A): pMW1947; pDctA(T395I): pMW2162; pDctA(L414A): pMW1271

A



B

DctA Varianten										
T73S	I87F	L219Q	S267A	S269A	T296A	L302A	L302M	L302M/ L309Q	T305A	L309Q
S340A	K341A	S380A	S380N	S380Q	R383N	A384T	E404A	E404D	E404N	L405A
D406A	D406N	L410A	D411N	D412N	R417A	A418S	P419A	D420A		

Abb. A5: DctA-Varianten mit wildtypischen Wachstum. (A) Lage der Varianten mit wildtypischem Wachstum (grün) im DctA Strukturmodell. Alle substituierten Aminosäurereste sind dargestellt. Die vermeintliche Bindetasche von DctA ist hervorgehoben (schwarzer Kasten). (B) Liste der DctA-Varianten mit wildtypischem Wachstum. pDctA(T73S): pMW2025; pDctA(I87F): pMW2026; pDctA(L219Q): pMW2027; pDctA(S267A): pMW1878; pDctA(S269A): pMW1944; pDctA(T296A): pMW1880; pDctA(L302A): pMW1857; pDctA(L302M): pMW1858; pDctA(L302M/L309Q): pMW1882; pDctA(T305A): pMW1946; pDctA(L309Q): pMW1861; pDctA(S340A): pMW1862; pDctA(K341A): pMW1863; pDctA(S380A): pMW1866; pDctA(S380N): pMW2159; pDctA(S380Q): pMW2158; pDctA(R383N): pMW2161; pDctA(A384T): pMW1871; pDctA(E404A): pMW1484; pDctA(E404D): pMW2028; pDctA(E404N): pMW2152; pDctA(L405A): pMW1485; pDctA(D406A): pMW1476; pDctA(D406N): pMW2153; pDctA(L410A): pMW1477; pDctA(D411N): pMW2154; pDctA(D412N): pMW2155; pDctA(R417A): pMW1274; pDctA(A418S): pMW1275; pDctA(P419A): pMW1276; pDctA(D420A): pMW1277

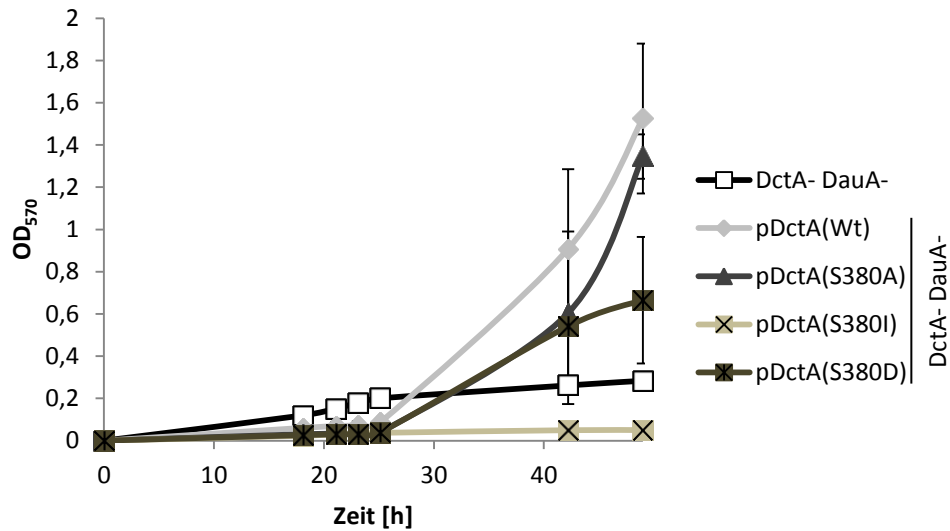


Abb. A6: Wachstumskomplementation des DctA/DauA-defizienten Stammes EK3 mit DctA-Varianten. Der Stamm EK3 (DctA- DauA-) wurde mit den Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μ M L-Arabinose exprimiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in eM9-Medium mit 50 mM Fumarat als Wachstumssubstrat. Die optische Dichte OD_{570nm} der Kulturen wurde nach regelmäßigen Abständen bestimmt. DctA- DauA-: EK3; pDctA(Wt): pMW1194; pDctA(S380A): pMW1866; pDctA(S380I): pMW1867; pDctA(S380D): pMW1868

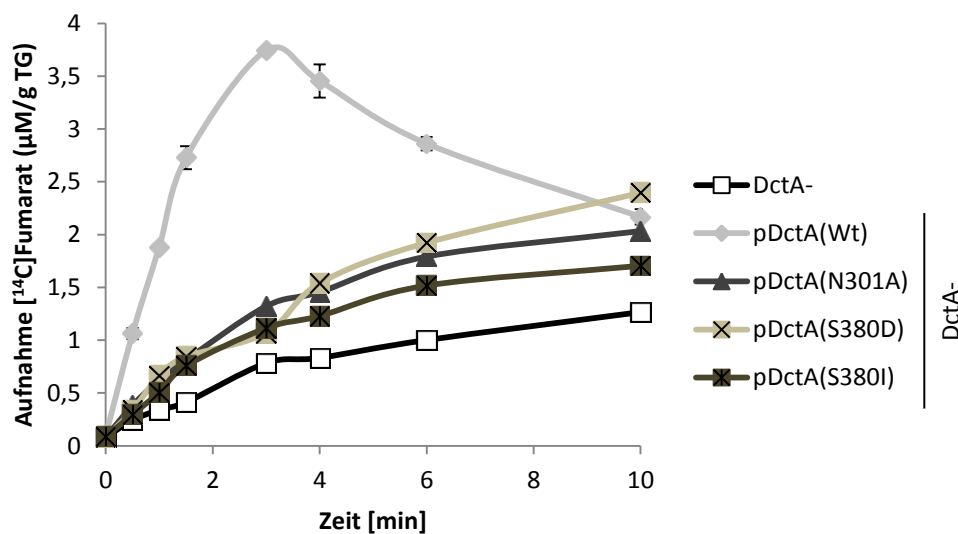


Abb. A7: Transportmessungen von DctA-Varianten. Der Stamm MDO800 (DctA-) wurde mit Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μ M L-Arabinose exprimiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium. Die Transportmessungen wurden mit 20 μ M [¹⁴C]-Fumarat durchgeführt. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden Proben entnommen. DctA- : MDO800; pDctA(Wt): pMW1194; pDctA(N301A): pMW1945; pDctA(S380D): pMW1868; pDctA(S380I): pMW1867

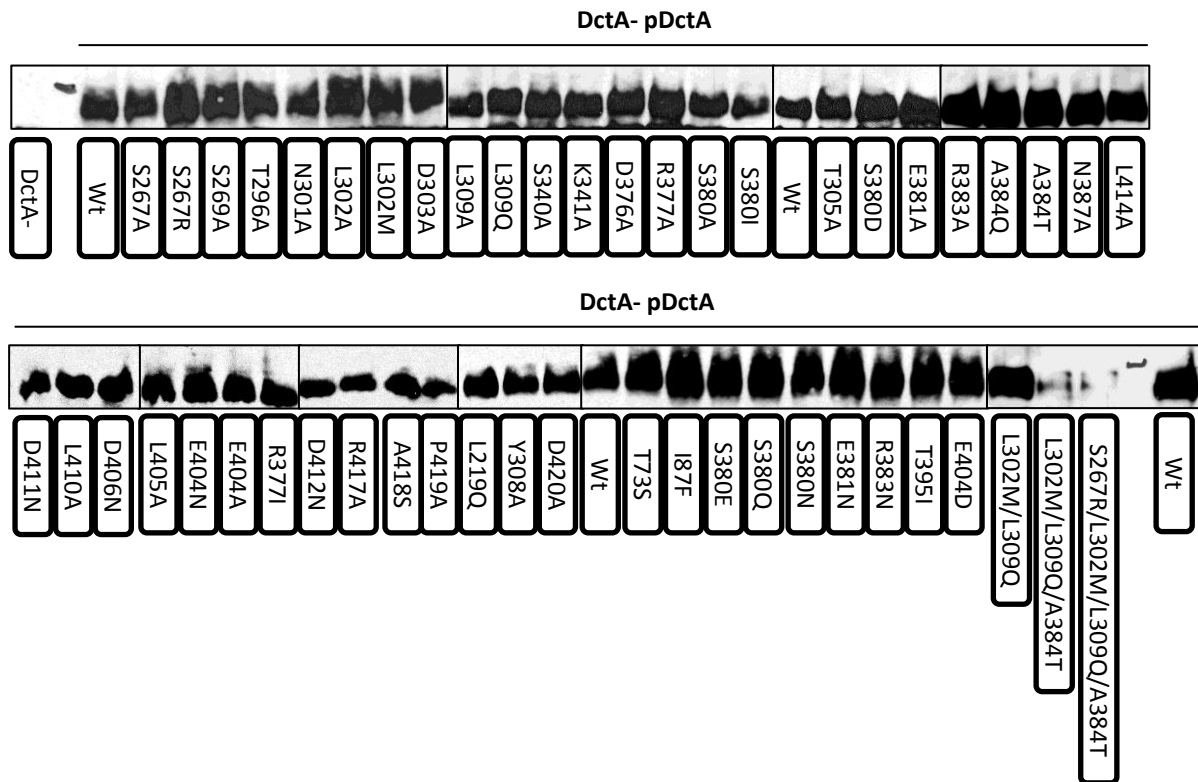


Abb. A8: Expressionsnachweis der DctA-Varianten. Der Stamm MDO800 wurde mit Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte aerob in LB Medium bei 30°C. Die Varianten von DctA wurden mit 670 µM L-Arabinose induziert. Pro Spur wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. DctA wurde mit Penta-His-Antikörper nachgewiesen. DctA-: MDO800; pDctA(Wt): pMW1194; pDctA(S267A): pMW1878; pDctA(S267R): pMW1879; pDctA(S269A): pMW1944; pDctA(T296A): pMW1880; pDctA(N301A): pMW1945; pDctA(L302A): pMW1857; pDctA(L302M): pMW1858; pDctA(D303A): pMW1859; pDctA(L309A): pMW1860; pDctA(L309Q): pMW1861; pDctA(S340A): pMW1862; pDctA(K341A): pMW1863; pDctA(D376A): pMW1864; pDctA(R377A): pMW1865; pDctA(S380A): pMW1866; pDctA(S380I): pMW1867; pDctA(T305A): pMW1946; pDctA(S380D): pMW1868; pDctA(E381A): pMW1869; pDctA(R383A): pMW1881; pDctA(A384Q): pMW1870; pDctA(A384T): pMW1871; pDctA(N387A): pMW1947; pDctA(L414A): pMW1271; pDctA(D411N): pMW2154; pDctA(L410A): pMW1477; pDctA(D406N): pMW2153; pDctA(L405A): pMW1485; pDctA(E404N): pMW2152; pDctA(E404A): pMW1484; pDctA(R377I): pMW2151; pDctA(D412N): pMW2155; pDctA(R417A): pMW1274; pDctA(A418S): pMW1275; pDctA(P419A): pMW1276; pDctA(L219Q): pMW2027; pDctA(Y308A): pMW2029; pDctA(D420A): pMW1277 pDctA(T73S): pMW2025; pDctA(I87F): pMW2026; pDctA(S380E): pMW2157; pDctA(S380Q): pMW2158; pDctA(S380N): pMW2159; pDctA(E381N): pMW2160; pDctA(R383N): pMW2161; pDctA(T395I): pMW2162; pDctA(E404D): pMW2028; pDctA(L302M/L309Q): pMW1882; pDctA(L302M/L309Q/A384T): pMW1952; pDctA(S267R/L302M/L309Q/A384T): pMW1948

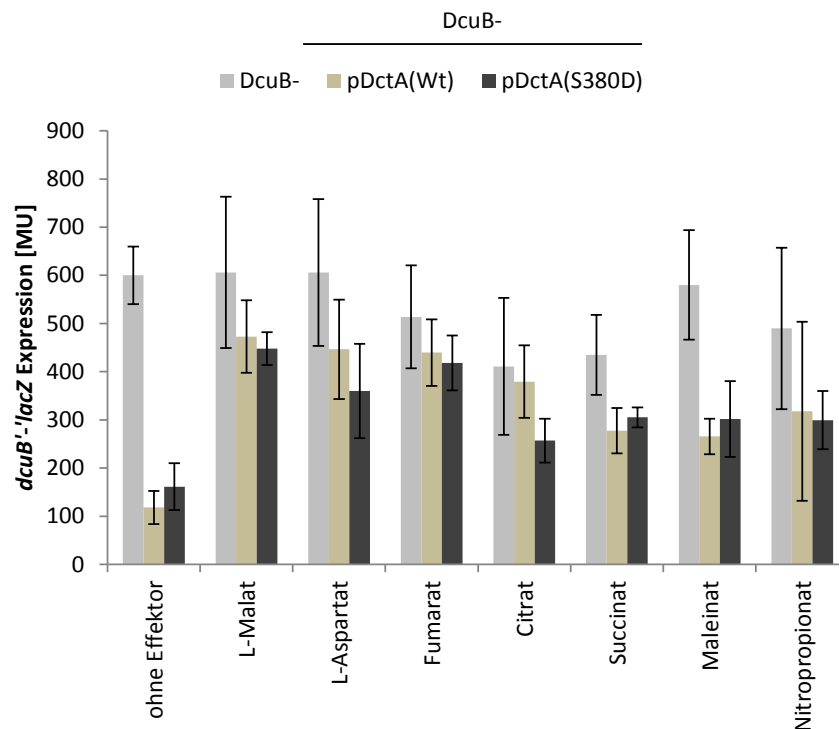


Abb. A9: Die Effektorspezifität von DcuS in dem DcuB-defizienten Stamm IMW503 in Anwesenheit von DctA-Varianten. Der DcuB-defiziente Stamm IMW503 (DcuB-) wurde mit Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μ M L-Arabinose induziert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die *dcuB-lacZ* Expression der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor. Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Effektoren dienen L-Malat, L-Aspartat, Fumarat, Citrat, Succinat, Maleinat jeweils mit 20 mM sowie Nitropropionat mit 10 mM. DcuB-: IMW503 (grau); pDctA(Wt): pMW1194 (beige); pDctA(S380D): pMW1868 (dunkelgrau)

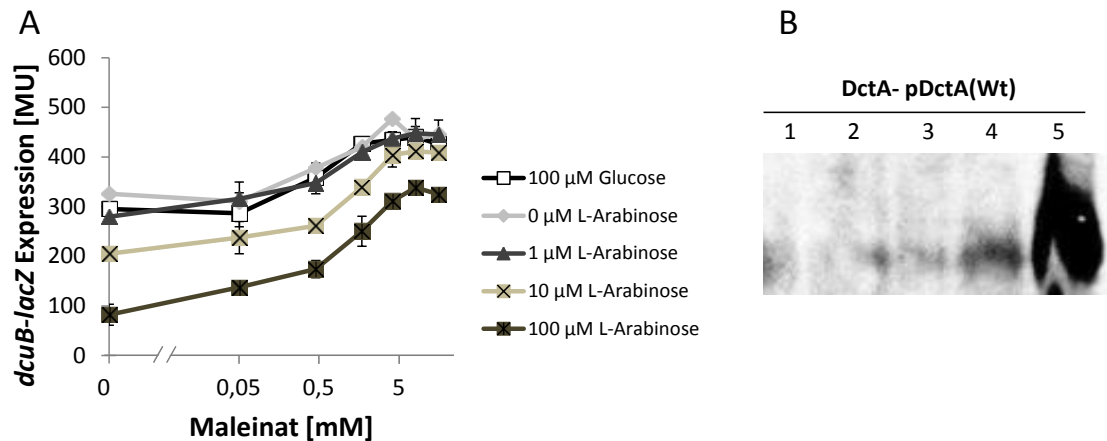


Abb. A10: Titration von pDctA(Wt) als Koregulator von DcuS. (A) Die Effekte von zunehmender DctA Expressionsstärke sowie steigender Maleinatkonzentrationen auf die *dcuB-lacZ* Expression in IMW503 (DcuB-) wurden durch β -Galactosidaseaktivitätsmessungen untersucht. Der DcuB-defiziente Stamm IMW503 (DcuB-) wurde mit dem Plasmid pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert. DctA wurde durch unterschiedliche L-Arabinosekonzentrationen (0-100 μ M) induziert oder durch Glucose (100 μ M) reprimiert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor. Maleinat (0-20 mM) diente als Effektor. Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. (B) Westernblot-Analyse der zunehmenden DctA-Konzentrationen. Pro Spur wurden 64 μ g Gesamtprotein aufgetragen. DctA wurde mit Penta-His-Antikörper nachgewiesen und folgendermaßen exprimiert: (1) 100 μ M Glucose; (2) 0 μ M L-Arabinose; (3) 1 μ M L-Arabinose; (4) 10 μ M L-Arabinose; (5) 100 μ M L-Arabinose. DcuB-: IMW503; pDctA(Wt): pMW1194

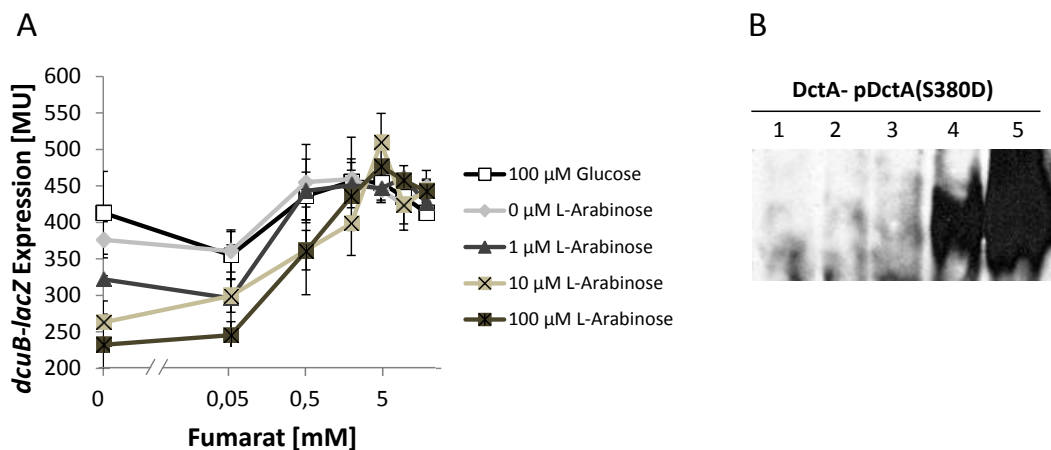


Abb. A11: Titration von pDctA(S380D) als Koregulator von DcuS. (A) Die Effekte von zunehmender DctA(S380D) Expressionsstärke sowie steigender Fumaratkonzentrationen auf die *dcuB-lacZ* Expression in IMW503 (DcuB-) wurden durch β -Galactosidaseaktivitätsmessungen untersucht. Der DcuB-defiziente Stamm IMW503 (DcuB-) wurde mit dem Plasmid pMW1868 (pDctA(S380D)) transformiert. DctA wurde durch unterschiedliche L-Arabinosekonzentrationen (0-100 μ M) induziert oder durch Glucose (100 μ M) reprimiert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor. Fumarat (0-20 mM) diente als Effektor. Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. (B) Westernblot-Analyse der zunehmenden DctA-Konzentrationen. Pro Spur wurden 64 μ g Gesamtprotein aufgetragen. DctA wurde mit Penta-His-Antikörper nachgewiesen und folgendermaßen exprimiert: (1) 100 μ M Glucose; (2) 0 μ M L-Arabinose; (3) 1 μ M L-Arabinose; (4) 10 μ M L-Arabinose; (5) 100 μ M L-Arabinose. DcuB-: IMW503; pDctA(S380D): pMW1868

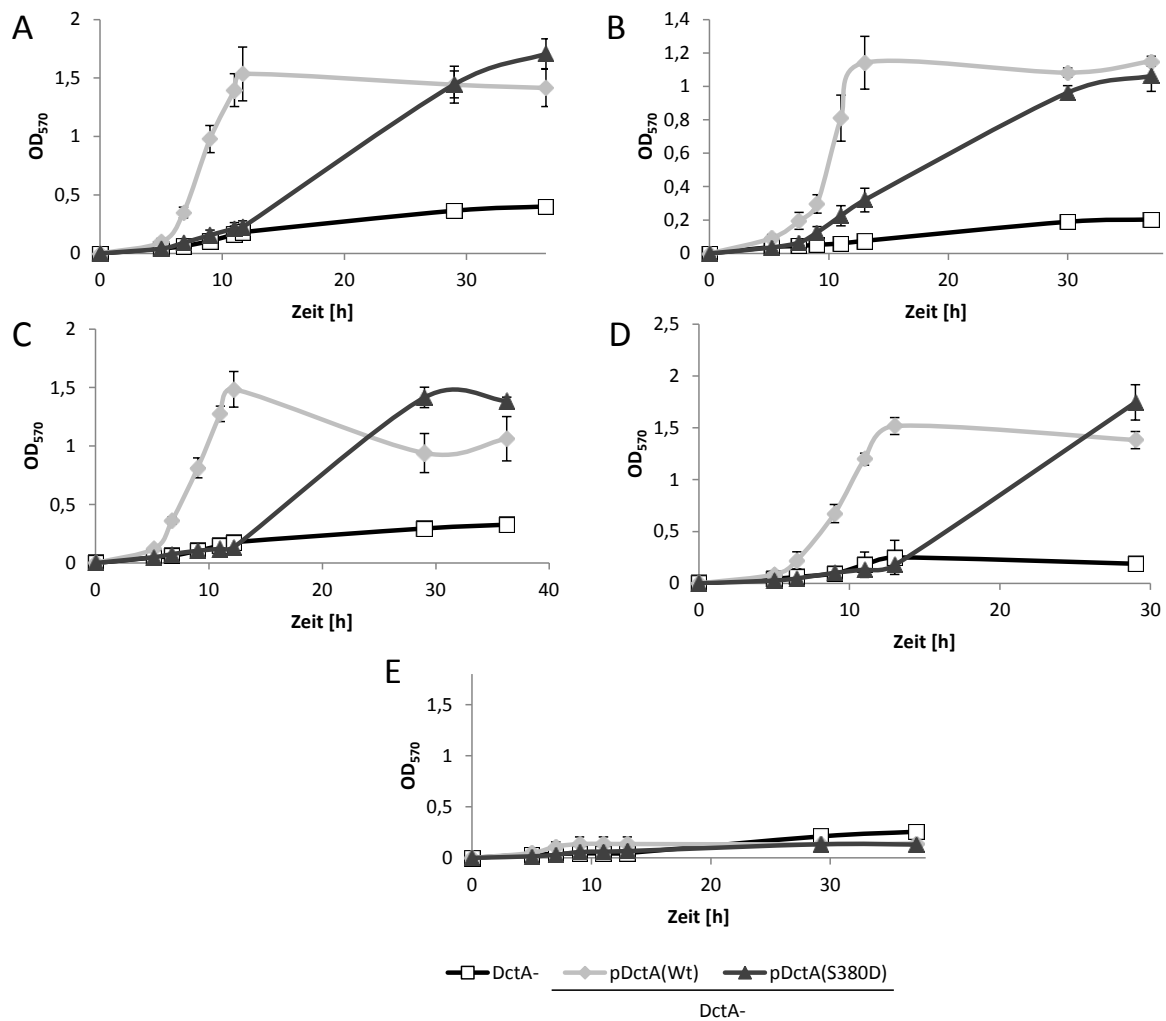


Abb. A12: Wachstumssubstrate von pDctA(Wt) und pDctA(S380D) im DctA-defizienten Stamm MDO800. Der DctA-defiziente Stamm MDO800 (DctA-) wurde mit den Derivaten des Plasmids pMW1194 (pDctA(Wt)) transformiert und mit 50 μ M L-Arabinose induziert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in eM9-Medium mit 50 mM Wachstumssubstrat. Die optische Dichte OD_{570nm} der Kulturen wurde nach regelmäßigen Abständen bestimmt. Als Wachstumssubstrate dienen L-Malat (A), L-Aspartat (B), Fumarat (C), Succinat (D) und Maleinat (E). DctA-: MDO800; pDctA(Wt): pMW1194; pDctA(S380D): pMW1868

DcuS-TM2 (182-201)	SIIW SVLFGMLVGLIGTCIL
Sequenz 1	---- SVLLGLLL GALLTL--
Sequenz 2	---- SVLLGVLLG VLLTL--
Sequenz 3	---- SLLLGVLLG VLLTL--
Sequenz 4	---- SLLLGILLG LLLGL--
Sequenz 5	---- SLLLGVLLG LLLAL--

Abb. A13: TM2 Sequenzvergleich. Vergleich der Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne 2 von DcuS aus *Escherichia coli* mit synthetischen Transmembranhelices, die jeweils hohes Potential zur Homodimerisierung aufweisen, aus der LEULIB Bibliothek (Russ & Engelman, 2000). Das Sequenzmotive SxxxGxxxG, welches in allen Sequenzen auftaucht, ist hervorgehoben.

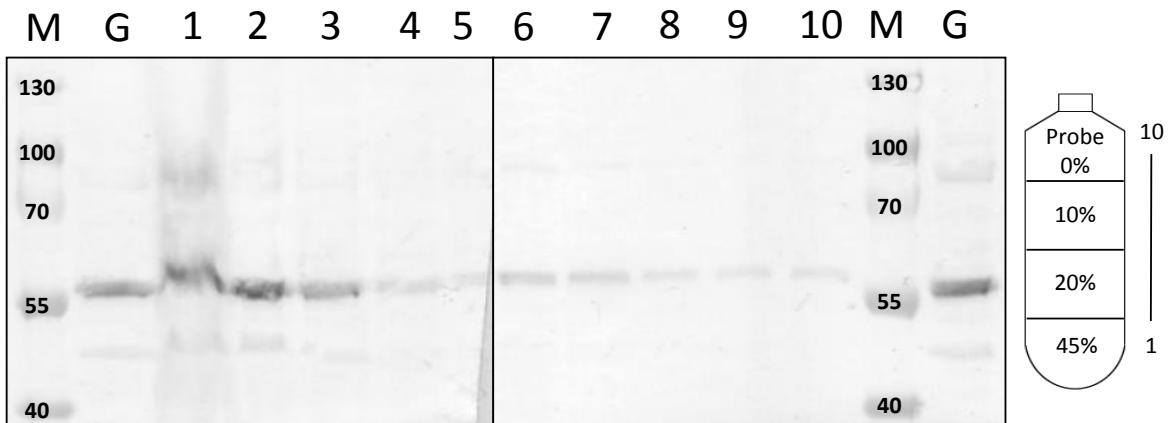


Abb. A14: Saccharosedichtegradient mit Zellhomogenat von pHis₆-DcuS(Wt) exprimierenden Zellen (C43(DE3)). Der Stamm C43(DE3) wurde mit Plasmid pMW151 (pHis₆DcuS(Wt)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} = 0,5-0,7. Anschließend wurden die Fusionen mit 1 mM IPTG für 3 Stunden induziert. Der Gradient wurde aus 0-45% Saccharoselösungen hergestellt und stufenweise aufgetragen. DcuS wurde mit DcuS-PAS_p-Antiserum und Chloronaphthol Entwicklung nachgewiesen. (M) Marker in kDa; (G) Gesamtprotein; (1)-(10): Fraktionen 1-10

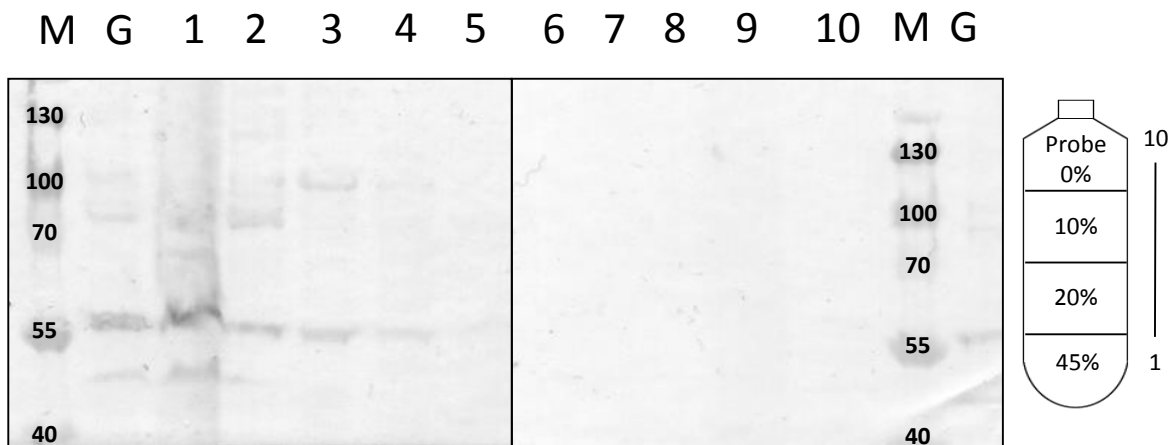


Abb. A15: Saccharosedichtegradient mit Zellhomogenat von pHis₆-DcuS(G190A/G194A) exprimierenden Zellen (C43(DE3)). Der Stamm C43(DE3) wurde mit Plasmid pMW1208 (pHis₆DcuS(G190A/G194A)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} = 0,5-0,7. Anschließend wurden die Fusionen mit 1 mM IPTG für 3 Stunden induziert. Der Gradient wurde aus 0-45% Saccharoselösungen hergestellt und stufenweise aufgetragen. DcuS wurde mit DcuS-PAS_p-Antiserum und Chloronaphthol Entwicklung nachgewiesen. (M) Marker in kDa; (G) Gesamtprotein; (1)-(10): Fraktionen 1-10

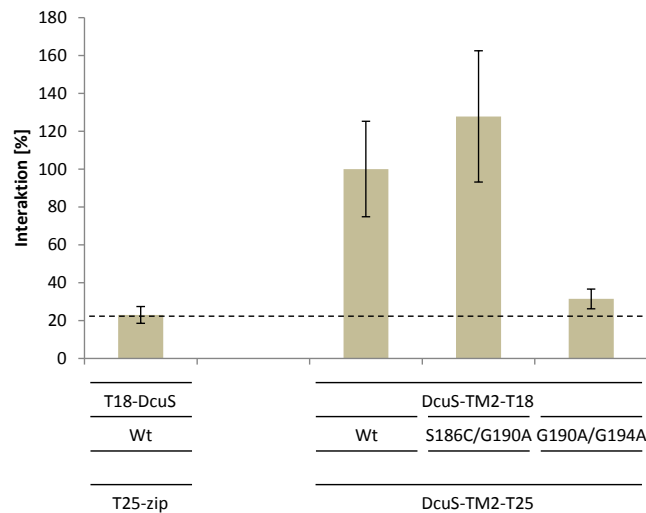


Abb. A16: Homodimerisierung von TM2 Varianten der verkürzten DcuS Fusionen DcuS-TM2-T18 und DcuS-TM2-T25. Der Stamm BTH101 wurde mit Derivaten der Plasmide pMW948 (DcuS-TM2-T18(Wt)) und pMW949 (DcuS-TM2-T25(Wt)) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium bei 30°C. Die Varianten der Fusionsprodukte DcuS-TM2-T18 und DcuS-TM2-T25 wurden durch 0,5 mM IPTG exprimiert. Die Interaktion zwischen DcuS-TM2-T18(Wt) und DcuS-TM2-T25(Wt) wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für Interaktion dar. Dieser wurde durch die Kombination T18-DcuS(Wt) und T25-zip(Wt) festgelegt. T18-Fusionen: T18-DcuS(Wt): pMW429; DcuS-TM2-T18(Wt): pMW948; DcuS-TM2-T18(S186C/G190A): pMW1213; DcuS-TM2-T18(G190A/G194A): pMW1215. T25-Fusionen: pT25-zip(Wt): pKT25-zip; DcuS-TM2-T25(Wt): pMW949; DcuS-TM2-T25(S186C/G190A): pMW1214; DcuS-TM2-T25(G190A/G194A): pMW1216.

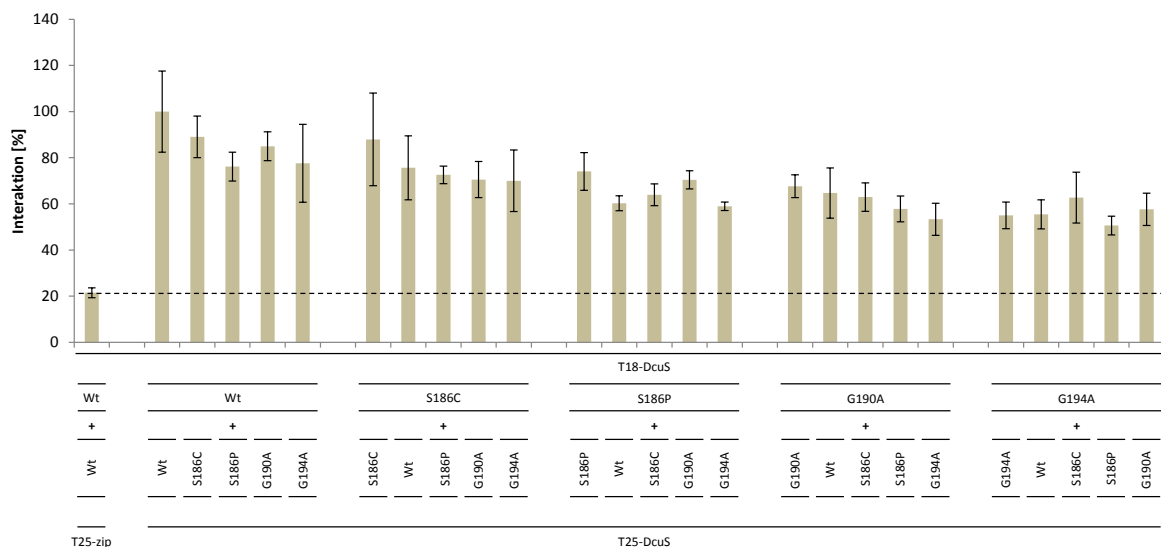


Abb. A17: Heterodimerisierung von TM2 Einzelmutanten der Fusionen T18-DcuS und T25-DcuS. Der Stamm BTH101 wurde mit Derivaten der Plasmide pMW429 (T18-DcuS(Wt)) und pMW426 (T25-DcuS(Wt)) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium bei 30°C. Die Varianten der Fusionsprodukte T18-DcuS und T25-DcuS wurden durch 0,5 mM IPTG exprimiert. Die β -Galactosidase-messungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Interaktion zwischen T18-DcuS(Wt) und T25-DcuS(Wt) wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für Interaktion dar. Dieser wurde durch die Kombination T18-DcuS(Wt) und T25-zip(Wt) festgelegt. T18-Fusionen: T18-DcuS(Wt): pMW429; T18-DcuS(S186C): pMW1752; T18-DcuS(S186P): pMW1712; T18-DcuS(G190A): pMW1754; T18-DcuS(G194A): pMW1755. T25-Fusionen: T25-zip(Wt): pKT25-zip; T25-DcuS(Wt): pMW426; T25-DcuS(S186C): pMW1748; T25-DcuS(S186P): pMW1711; T25-DcuS(G190A): pMW1750; T25-DcuS(G194A): pMW1751.

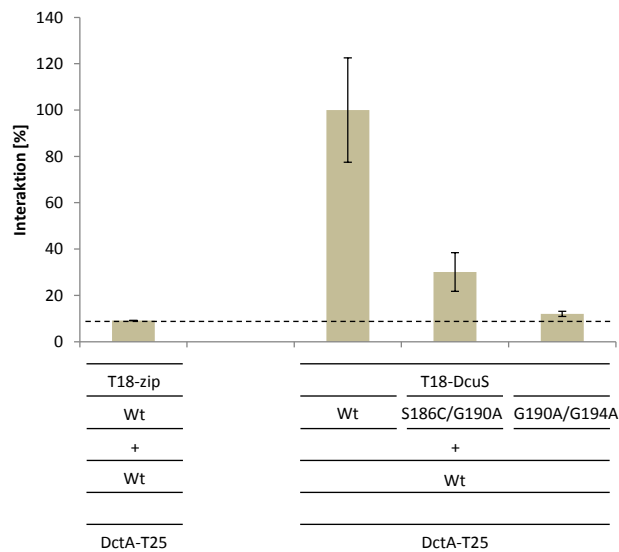


Abb. A18: Interaktion von TM2 Varianten von T18-DcuS mit DctA-T25. Der Stamm BTH101 wurde mit Derivaten des Plasmids pMW429 (T18-DcuS(Wt)) und pMW858 (DctA-T25(Wt)) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium bei 30°C. Die Varianten der Fusionsprodukte T18-DcuS und DctA-T25 wurden durch 0,5 mM IPTG exprimiert. Die Interaktion zwischen T18-DcuS(Wt) und DctA-T25(Wt) wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für Interaktion dar. Dieser wurde durch die Kombination T18-clip(Wt) und DctA-T25(Wt) festgelegt. T18-Fusionen: T18-clip(Wt): pUT18C-clip; T18-DcuS(Wt): pMW429; T18-DcuS(S186C/G190A): pMW1210; T18-DcuS(G190A/G194A): pMW1212. T25-Fusionen: DctA-T25(Wt): pMW858.

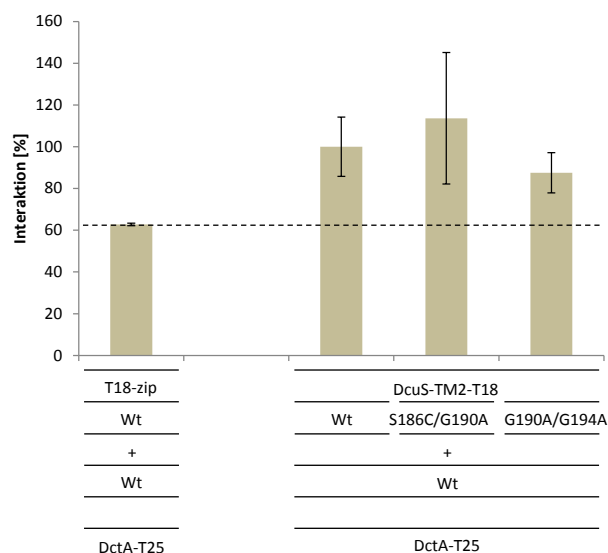


Abb. A19: Interaktion von TM2 Varianten von DcuS-TM2-T18 mit DctA-T25. Der Stamm BTH101 wurde mit Derivaten des Plasmids pMW948 (DcuS-TM2-T18(Wt)) und pMW858 (DctA-T25(Wt)) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium bei 30°C. Die Varianten der Fusionsprodukte DcuS-TM2-T18 und DctA-T25 wurden durch 0,5 mM IPTG exprimiert. Die Interaktion zwischen DcuS-TM2-T18(Wt) und DctA-T25(Wt) wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für Interaktion dar. Dieser wurde durch die Kombination T18-clip(Wt) und DctA-T25(Wt) festgelegt. T18-Fusionen: T18-clip(Wt): pUT18C-clip; DcuS-TM2-T18(Wt): pMW948; DcuS-TM2-T18(S186C/G190A): pMW1213; DcuS-TM2-T18(G190A/G194A): pMW1215. T25-Fusionen: DctA-T25(Wt): pMW858.

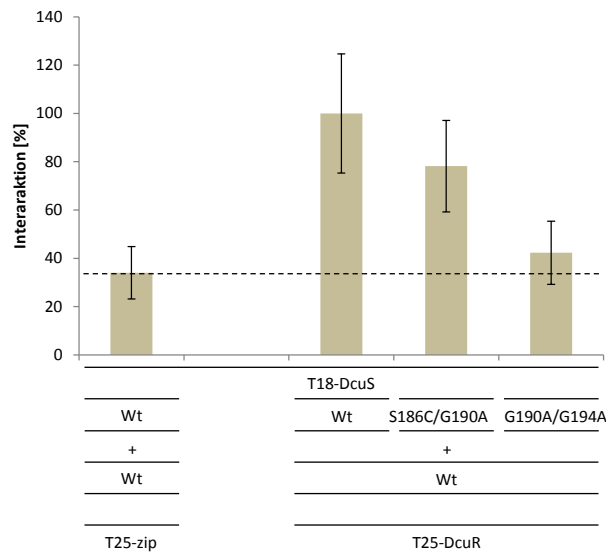


Abb. A20: Interaktion von TM2 Varianten von T18-DcuS mit T25-DcuR. Der Stamm BTH101 wurde mit Derivaten des Plasmids pMW429 (T18-DcuS(Wt)) und pMW427 (T25-DcuR(Wt)) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB Medium bei 30°C. Die Varianten der Fusionsprodukte T18-DcuS und T25-DcuR wurden durch 0,5 mM IPTG exprimiert. Die β -Galactosidasemessungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Interaktion zwischen T18-DcuS(Wt) und T25-DcuR(Wt) wurde auf 100% gesetzt und alle weiteren Werte entsprechend standardisiert. Die gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für Interaktion dar. Dieser wurde durch die Kombination T18-DcuS(Wt) und T25-zip(Wt) festgelegt. T18-Fusionen: T18-DcuS(Wt): pMW429; T18-DcuS(S186C/G190A): pMW1210; T18-DcuS(G190A/G194A): pMW1212. T25-Fusionen: T25-zip: pKT25-zip(Wt); T25-DcuR(Wt): pMW427.



Abb. A21: Expressionsnachweis der TM1 und TM2 GALLEX-Konstrukte. Der Stamm JM109 wurde mit den GALLEX-Konstrukten (siehe unten) transformiert. Die Kultivierung erfolgte aerob in LB Medium bei 30°C. Die Fusionsprodukte wurden mit 5 μ M IPTG induziert. Pro Spur wurden 100 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Die Konstrukte wurden mit MBP-Antiserum nachgewiesen. (1) JM109; (2) TM1_{DcuS[16]}(Wt): pMW1968; (3) TM1_{DcuS[17]}(Wt): pMW1967; (4) TM2_{DcuS[16]}(S186C/G190A): pMW1965; (5) TM2_{DcuS[16]}(G190A/G194A): pMW1964; (6) TM2_{DcuS[16]}(Wt): pMW1963; (7) TM2_{DcuS[17]}(Wt): pMW1961

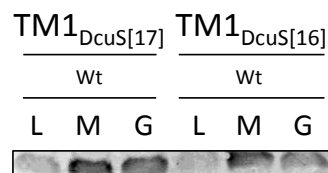


Abb. A22: Membranintegration der TM1 GALLEX-Konstrukte. Der Stamm NT326 wurde mit pMW1967 (LexA-TM1_{DcuS[17]}-MBP) oder pMW1968 (LexA-TM1_{DcuS[16]}-MBP) transformiert. Die Kultivierung erfolgte aerob in LB Medium bei 30°C. Die Fusionsprodukte wurden mit 5 μ M IPTG induziert. Pro Spur wurden die löslichen Proteine (L), die Membranproteine (M) oder das Gesamtprotein (G) aus 1 ml Kultur aufgetragen. Die Konstrukte wurden mit MBP-Antiserum nachgewiesen. Konstrukte: TM1_{DcuS[17]}(Wt): pMW1967; TM1_{DcuS[16]}(Wt): pMW1968.

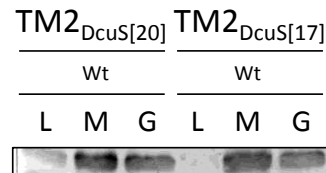


Abb. A23: Membranintegration der TM2 GALLEX-Konstrukte. Der Stamm NT326 wurde mit pMW1960 (LexA-TM2_{DcuS[20]}-MBP) oder pMW1961 (LexA-TM2_{DcuS[17]}-MBP) transformiert. Die Kultivierung erfolgte aerob in LB Medium bei 30°C. Die Fusionsprodukte wurden mit 5 µM IPTG induziert. Pro Spur wurden die löslichen Proteine (L), die Membranproteine (M) oder das Gesamtprotein (G) aus 1 ml Kultur aufgetragen. Die Konstrukte wurden mit MBP-Antiserum nachgewiesen. Konstrukte: TM2_{DcuS[20]}(Wt): pMW1960; TM2_{DcuS[17]}(Wt): pMW1961.



Abb. A24: Wachstumskomplementation des MBP-defizienten Stammes NT326 mit den TM1 und TM2 GALLEX-Konstrukten. Der Stamm NT326 (MBP-) wurde mit den GALLEX-Konstrukten (siehe unten) komplementiert. Die Kultivierung erfolgte aerob bei 37°C auf M9 Agarplatten. Als Kohlenstoffquelle diente Maltose (0,4%) und die Konstrukte wurden mit IPTG (0,02%) induziert. (1) MBP-: NT326; (2) TM2_{DcuS[17]}(S186C/G190A); (3) TM2_{DcuS[17]}(G190A/G194A): pMW1962; (4) TM2_{DcuS[17]}(Wt): pMW1961; (5) TM2_{DcuS[16]}(S186C/G190A): pMW1965; (6) TM2_{DcuS[16]}(G190A/G194A): pMW1964; (7) TM2_{DcuS[16]}(Wt): pMW1963; (8) TM1_{DcuS[17]}(Wt): pMW1967; (9) TM1_{DcuS[16]}(S26R): pMW1969; (10) TM1_{DcuS[16]}(Wt): pMW1968; (11) pBLM100

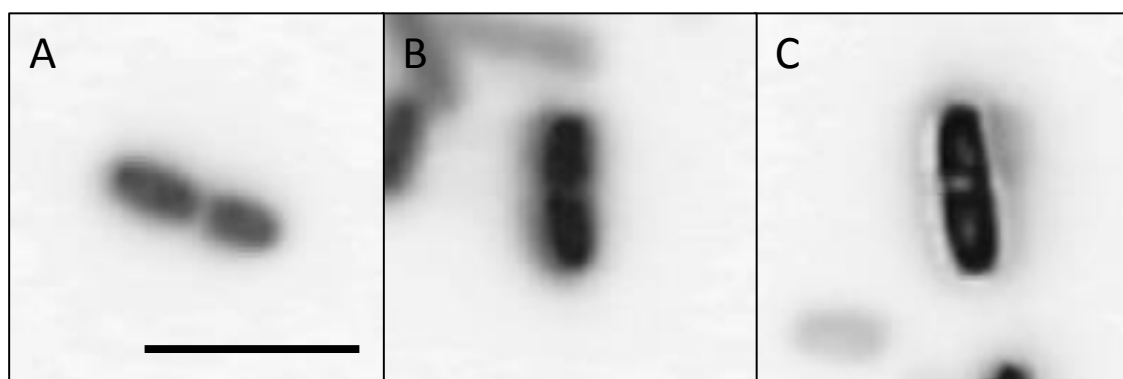


Abb. A25: Lokalisierung von YFP(A206K)-linker-DcuR mit zunehmenden Expressionsstärke. *E. Coli* Stamm IMW238 (DcuR-) wurde mit Plasmid pMW1953 (YFP(A206K)-linker-DcuR) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 - 0,9. Anschließend wurden die Fusionen mit unterschiedlichen L-Arabinosekonzentrationen (50-333 µM) für 1 Stunde induziert. Die schwarze Skalierung beträgt 5 µM. Expressionsstärke: (A) 50 µM L-Arabinose; (B) 133 µM L-Arabinose; (C) 333 µM L-Arabinose.

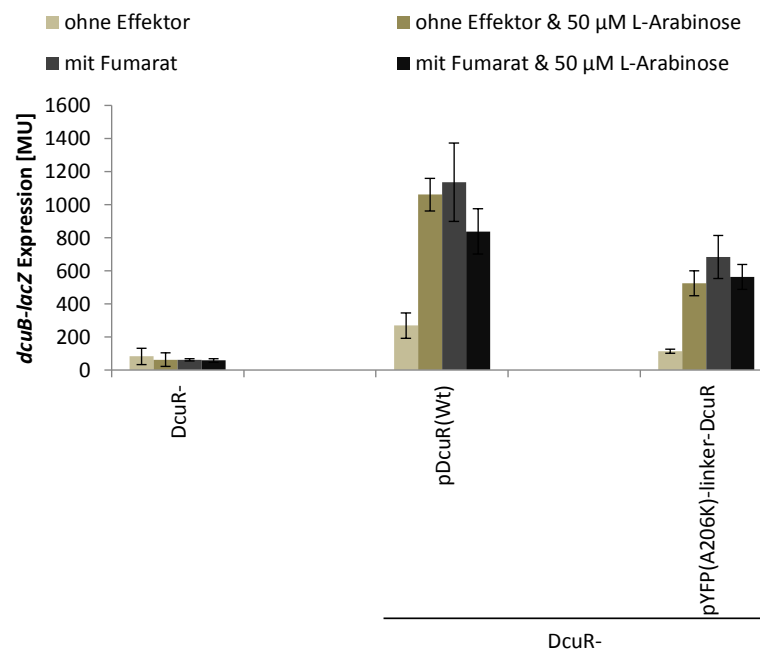


Abb. A26: Einfluss der Expressionsstärke von pDcuR oder pYFP(A206K)-linker-DcuR auf die Expression von *dcuB-lacZ* im Stamm IMW238 (DcuR-). Der DcuR-defiziente Stamm IMW238 (DcuR-) wurde mit pMW1740 (pDcuR(Wt)) oder pMW1953 (pYFP(A206K)-linker-DcuR) transformiert. Die Expressionsstärke der DcuR-Varianten wurde mit 50 µM und ohne L-Arabinose variiert. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium und die Expression von *dcuB-lacZ* der Kulturen wurde anhand der β -Galactosidase ermittelt. Dabei diente 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle und 20 mM DMSO als Elektronenakzeptor (beige/braune Balken). 20 mM Fumarat wurde als Effektor verwendet (dunkelgraue/schwarze Balken). DcuR-: IMW238; pDcuR(Wt): pMW1740; pYFP(A206K)-linker-DcuR: pMW1953

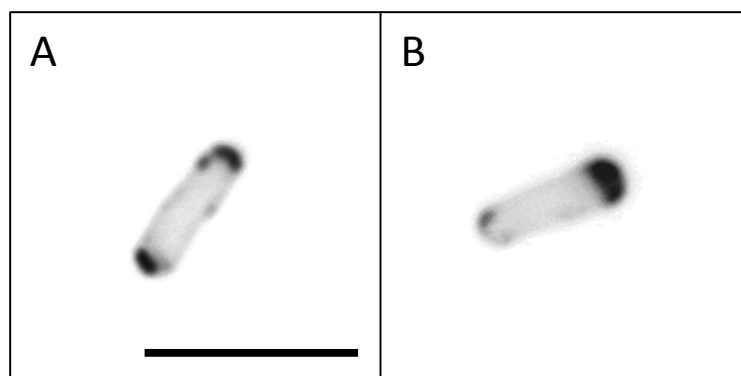


Abb. 27: Vergleich der Lokalisierung von DcuS-YFP(Wt) (A) mit DcuS-YFP(A206K) (B) im DauA-negativen Hintergrund. Der Stamm EK1 (DauA-) wurde mit den Plasmiden pMW407 (DcuS-YFP(Wt)) oder pMW1891 (DcuS-YFP(A206K)) transformiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,7 - 0,9. Die Fusionen wurden von Beginn an mit 133 µM L-Arabinose induziert. Die schwarze Skalierung beträgt 5 µM. (A) DcuS-YFP(Wt): pMW407; (B) DcuS-YFP(A206K): pMW1891

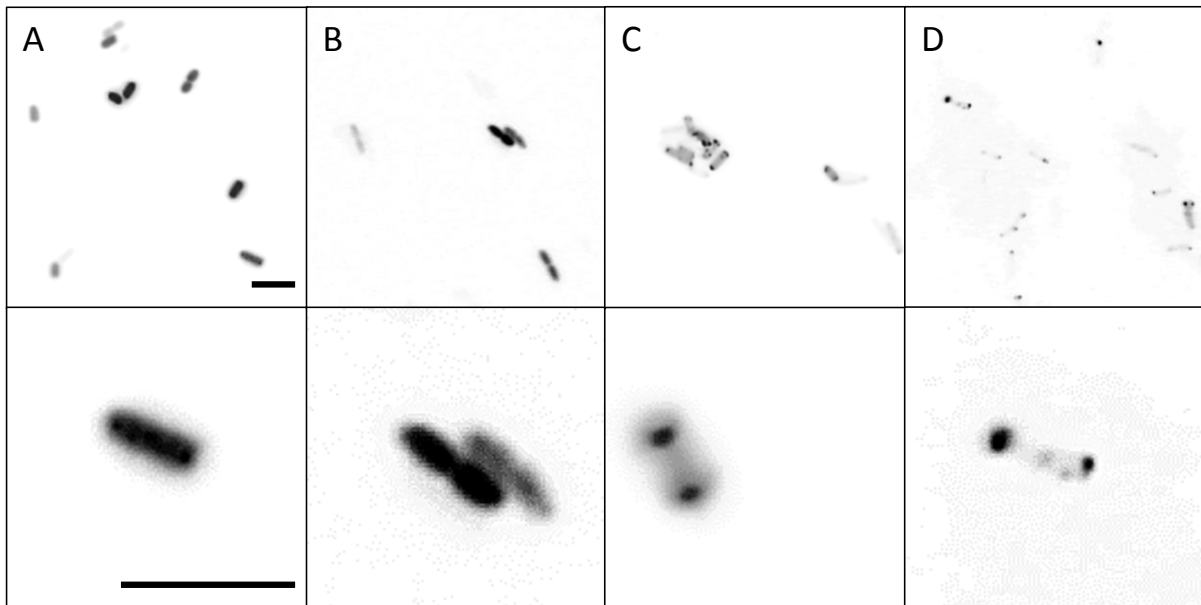


Abb. A28: Einfluss von Fumarat auf die Lokalisierung von YFP(A206K)-linker-DcuR. Das Plasmid pMW1953 (YFP(A206K)-linker-DcuR) wurde in Stamm IMW238 (DcuR-) transformiert (A & B) oder in Kombination mit Plasmid pMW1390(His₆-DcuS(Wt)) in Stamm C43 transformiert (C & D). Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium ohne (A & C) bzw. mit 50 mM Fumarat (B & D) bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,7. Anschließend wurden die Fusionen mit L-Arabinose (A & B: 133 µM; C & D: 333 µM) für 1 Stunde induziert. Die obere Bilderreihe zeigt Übersichtansichten, die untere Nahaufnahmen. Die schwarzen Skalierungsbalken betragen 5 µM. (A) YFP(A206K)-linker-DcuR: pMW1953 in IMW238 (DcuR-) ohne Fumarat; (B) YFP(A206K)-linker-DcuR: pMW1953 in IMW238 (DcuR-) mit Fumarat (50 mM); (C) YFP(A206K)-linker-DcuR: pMW1953 & His₆-DcuS(Wt): pMW1390 in C43 ohne Fumarat; (D) YFP(A206K)-linker-DcuR: pMW1953 & His₆-DcuS(Wt): pMW1390 in C43 mit Fumarat (50 mM)

8 Veröffentlichungen und Präsentationen

Veröffentlichungen

Steinmetz, P.A., Wörner, S., and Uden, G. (2014) Differentiation of DctA and DcuS function in the DctA/DcuS sensor complex of *Escherichia coli*. Function of DctA as an activity switch and of DcuS as the C₄-dicarboxylate sensor. *Molecular Microbiology*, doi: 10.1111/mmi.12759.

In dieser Publikation wurden Teile der Dissertation veröffentlicht. Da die Veröffentlichung parallel zur Dissertation geschrieben wurde und erst kurz vor Abgabe der Dissertation angenommen wurde, wird diese Publikation nicht in der Dissertation zitiert.

Uden, G., Steinmetz, P., and Degreif-Dünnwald, P. (2014) The Aerobic and Anaerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Enzymes and Energetics. *EcoSal Plus 2014*.

Witan, J., Bauer, J., Wittig, I., Steinmetz, P., Erker, W., and Uden G. (2012) Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Molecular Microbiology*, **85**: 846–861.

Uden, G., und Steinmetz, P. (2012) Milchsäurebakterien in der Weinbereitung. In *Kulturgut Rebe und Wein*. König, H., and Decker, H. (eds) . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 143–150.

Poster

Scheu, P., Steinmetz, P.A., and Uden, G. (2012) Polar localization of trimeric DcuS-DctA-DcuR sensor-regulator complex. 29th Symposium „Mechanisms of Gene Regulation“ Wartaweil, Herrsching am Ammersee

Steinmetz, P.A., and Uden, G. (2012) The transmembrane domain of the sensory histidine kinase DcuS: role in dimerization. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Tübingen

9 Danksagung

10 Lebenslauf

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst angefertigt wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, September 2014