

**Bindeprotein-abhängige DctS-Sensorkinasen aus
Bacillus subtilis und *Geobacillus kaustophilus***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von

Sabrina Graf

geb. am 18.10.1983 in Darmstadt

Mainz, September 2013

Inhalt

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Regulation des Energiestoffwechsels in <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i>	2
2.2 Regulation des C ₄ -Dicarboxylatstoffwechsels in <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	4
2.3 Bindeproteine in Transport- und Signaltransduktionssystemen.....	8
2.4 Das DctSRPQM-System aus <i>Rhodobacter capsulatus</i>	10
2.5 Ziele dieser Arbeit	12
3 Material und Methode	13
3.1 Verwendete Stämme und Plasmide von <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i>	13
3.2 Zucht und Medien.....	22
3.2.1 Zucht von <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i>	22
3.2.2 Medien und Puffer	25
3.3 Molekulargenetische Methoden.....	35
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion	36
3.3.2 Konstruktion von Plasmiden	37
3.3.3 Stammkonstruktion in <i>Bacillus subtilis</i>	44
3.3.4 Amplifikation der <i>dcuS</i> -, <i>dcuB</i> - und <i>citA</i> -Promotorbereiche	49
3.4 Biochemische Methoden.....	49
3.4.1 Protein-Protein Interaktionsstudien mittels mSPINE und mHPINE	49
3.4.2 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität in <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	51
3.4.3 Transportmessungen in <i>B. subtilis</i>	52
3.4.4 Expression und Reinigung von DcuS-ähnlichen Sensorkinasen	53
3.4.5 Rekonstitution von His ₆ -DctS _{Gk} in Liposomen	53
3.4.6 Nachweis der Rekonstitution durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation	54
3.4.7 Phosphorylierung von DctS _{Gk} und DcuS _{Ec}	55
3.4.8 Gelretardation von DNA-Promotorbereichen.....	56
3.5 Bioinformatische Methoden.....	57
4 Ergebnisse	58
4.1 Bildung eines trimeren DctS/DctA/DctB-Komplexes in <i>B. subtilis</i>	58
4.1.1 Das Bindeprotein-abhängige C ₄ -Dicarboxylatsystem aus <i>R. capsulatus</i> und <i>B. subtilis</i>	58
4.1.2 <i>In vivo</i> Interaktion zwischen DctS, DctB und DctA: mSPINE/mHPINE und BACTH.....	61
4.1.3 <i>In vivo</i> Interaktion von DctB mit der Sensorkinase DctS aus <i>B. subtilis</i>	63
4.1.4 <i>In vivo</i> Interaktion von DctA mit der Sensorkinase DctS aus <i>B. subtilis</i>	67
4.1.5 Interaktionsstudien zwischen DctB und DctA	69
4.1.6 Bildung einer DctS/DctA/DctB-Sensoreinheit	73
4.2 Charakterisierung der Sensorkinase DctS aus <i>Geobacillus kaustophilus</i>	74
4.2.1 Substratspektrum von DctS _{Gk} im anaeroben und aeroben Komplementationstest.....	79
4.2.2 Untersuchung von PASp-Mutanten in DctS _{Gk}	82
4.2.3 Rekonstitution von DctS _{Gk} in Liposomen.....	85

4.2.4 <i>In vitro</i> Phosphorylierung von DctS _{Gk}	87
4.2.5 Komplementationsstudien mit DctS _{Gk} in <i>Bacillus subtilis</i>	93
4.2.6 Expression und Reinigung weiterer Sensorkinasen mit Homologie zu DcuS _{Ec}	98
4.3 Interaktion zwischen Komponenten des DcuSR- und CitAB-Systems in <i>E. coli</i>	102
5 Diskussion.....	105
5.1 Bildung eines trimeren DctS/DctA/DctB-Komplexes in <i>B. subtilis</i>	105
5.1.1 Rolle von DctA und DctB im DctS/DctA/DctB-Komplex in <i>B. subtilis</i>	105
5.1.2 Ligandenbindung in DctP-Proteinen: Konservierte Bindetasche in DctB	108
5.1.3 Mechanismus der Sensor/Bindeprotein-Interaktion am Beispiel von LuxQP	112
5.1.4 DctP-Bindeproteine mit potentieller Cosensor-Funktion	114
5.2 Stoffwechselregulation in Thermophilen: Sensoren der CitA-Familie	116
5.2.1 Das DctSR-System aus <i>Geobacillus kaustophilus</i>	117
5.2.2 Das CitAB-System aus <i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	120
6 Literatur	124
7 Veröffentlichungen und Präsentationen	135

1 Zusammenfassung

Das Enterobakterium *Escherichia coli* sowie das Bodenbakterium *Bacillus subtilis* können C₄-Dicarbonsäuren als aerobe Kohlenstoffquelle zur Energiekonservierung nutzen. Die Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels erfolgt in *E. coli* und *B. subtilis* durch das Zweikomponentensystem DcuSR_{Ec} bzw. DctSR_{Bs}, bestehend aus einer Sensorkinase und einem Responseregulator. Diese kontrollieren die Expression des C₄-Dicarboxylat-Transporters DctA. Der Sensor DcuS_{Ec} benötigt für seine Funktion im aeroben Stoffwechsel den Transporter DctA als Cosensor. Für das DctSR_{Bs}-System gibt es Hinweise aus genetischen Untersuchungen, dass DctS_{Bs} das Bindeprotein DctB_{Bs} und möglicherweise auch DctA_{Bs} als Cosensoren für seine Funktion benötigt.

In dieser Arbeit sollte ein direkter Nachweis geführt werden, ob DctB_{Bs} und DctA_{Bs} gemeinsam oder nur jeweils eine der Komponenten als Cosensoren für DctS_{Bs} fungieren. Sowohl für DctB_{Bs} als auch für DctA_{Bs} wurde eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit DctS_{Bs} durch zwei *in vivo* Interaktionsmethoden nachgewiesen. Beide Methoden beruhen auf der Co-Reinigung der Interaktionspartner mittels Affinitätschromatographie und werden je nach Affinitätssäule als mSPINE oder mHPINE (Membrane Strep/His-Protein Interaction Experiment) bezeichnet. Die Interaktion von DctS_{Bs} mit DctB_{Bs} wurde zusätzlich über ein bakterielles Two-Hybrid System nachgewiesen. Nach Coexpression mit DctS_{Bs} interagieren DctA_{Bs} und DctB_{Bs} in mSPINE-Tests gleichzeitig mit der Sensorkinase. DctS_{Bs} bildet somit eine sensorische DctS/DctA/DctB-Einheit in *B. subtilis* und das Bindeprotein DctB_{Bs} agiert nur als Cosensor, nicht aber als Transport-Bindeprotein. Eine direkte Interaktion zwischen dem Transporter DctA_{Bs} und dem Bindeprotein DctB_{Bs} besteht nicht. Transportmessungen belegen, dass der DctA-vermittelte Transport von [¹⁴C]-Succinat unabhängig ist von DctB_{Bs}.

Außerdem wurde untersucht, ob Zweikomponentensysteme aus anderen Bakteriengruppen nach einem ähnlichen Schema wie DcuSR_{Ec} bzw. DctSR_{Bs} aufgebaut sind. Das thermophile Bakterium *Geobacillus kaustophilus* verfügt über ein DctSR-System, welches auf genetischer Ebene mit einem Transporter des DctA-Typs und einem DctB-Bindeprotein geclustert vorliegt. Die Sensorkinase DctS_{Gk} wurde in *E. coli* heterolog exprimiert und gereinigt. Diese zeigt in einer *E. coli* DcuS-Insertionsmutanten Komplementation der DcuS-Funktion und besitzt dabei Spezifität für die C₄-Dicarbonsäuren Malat, Fumarat, L-Tartrat und Succinat sowie für die C₆-Tricarbonsäure Citrat. In Liposomen rekonstituiertes DctS_{Gk} zeigt Autokinase-Aktivität nach Zugabe von [^γ-³³P]-ATP. Der K_D-Wert für [^γ-³³P]-ATP der Kinasedomäne von DctS_{Gk} liegt bei 43 μM, die Affinität für ATP ist damit etwa 10-fach höher als in DcuS_{Ec}.

2 Einleitung

2.1 Regulation des Energiestoffwechsels in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*

Viele Bakterien sind häufig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt und es erfolgt daher eine Anpassung des Energiestoffwechsels in Abhängigkeit von äußeren Faktoren. *E. coli* gehört zu den gramnegativen Enterobakterien, während *B. subtilis* zu den Vertretern der grampositiven Bodenbakterien zählt. Beide Bakterienarten können im Energiestoffwechsel eine Vielzahl an Kohlenstoffquellen nutzen. Die bevorzugte Kohlenstoff- und Energiequelle von *E. coli* und *B. subtilis* ist Glucose. Zusätzlich verwendet *B. subtilis* neben Glucose auch die C₄-Dicarbonsäure Malat als bevorzugte Kohlenstoffquelle (Kleijn et al., 2010). Bei Verfügbarkeit eines energetisch begünstigteren Energiesubstrates werden die Stoffwechselwege zur Verwertung alternativer Substrate auf der Transkriptionsebene abgeschaltet. Diese als Katabolitrepression bezeichnete Regulation wird im Wesentlichen durch Mechanismen des Phosphotransferasesystems in *E. coli* und *B. subtilis* bewerkstelligt (Deutscher et al., 2006; Blencke et al., 2003; Lulko et al., 2007). Phosphotransferasesysteme (PTS-Systeme) gewährleisten den Transport von Hexosen in Bakterien. Dabei wird das Substrat in die Zelle aufgenommen und über mehrere Proteinkinasen direkt phosphoryliert. In *E. coli* und *B. subtilis* dienen jeweils unterschiedliche Proteinkinasen des PTS-Systems als Schlüsselkomponente der Katabolitrepression.

In *E. coli* ist das Verhältnis an phosphoryliertem zu unphosphoryliertem EIIA-Protein entscheidend. Bei Glucosemangel ist der Phosphorylierungsgrad der EIIA-Proteinkinase hoch. In diesem Zustand aktiviert EIIA die Adenylatzyklase und es kommt zur Bildung von cAMP. Im Zusammenwirken mit cAMP wirkt das CRP-Protein (cAMP Receptor Protein) als Transkriptionsaktivator für die Expression zur Aufnahme alternativer Kohlenstoffquellen. In *E. coli* kommt es bei Anwesenheit von Glucose zusätzlich zum Induktorausschluss. Das EIIA-Protein inhibiert dabei in seiner dephosphorylierten Form durch direkte Protein-Protein Interaktion die Transportsysteme alternativer Hexosen.

Das PTS-System zur Aufnahme von Glucose in *B. subtilis* ähnelt jenem von *E. coli*. Hier ist jedoch die EIIA-Komponente Teil des membranständigen Glucosecarriers EIIBC. Die Katabolitrepression wird in *B. subtilis* durch die HPr (Histidin Protein)-Komponente bewerkstelligt. Bei Anwesenheit von Glucose erfolgt die durch Fructose-1,6-bisphosphat vermittelte Aktivierung der bifunktionalen Hpr Kinase/Phosphorylase (HprK/P). Diese katalysiert eine regulatorische Phosphorylierung des Serinrestes Ser46 von HPr (Deutscher et al., 2006). In dieser Form (Hpr (Ser-P)) interagiert HPr mit dem globalen Transkriptionsregulator CcpA (Catabolite control protein A) aus *B. subtilis*. Der HPr (Ser-P)/CcpA-Komplex reprimiert

die Expression von Genen alternativer Stoffwechselwege. Da in *B. subtilis* neben Glucose auch Malat ein bevorzugtes Energiesubstrat ist, zeigt dieses ebenso Katabolitrepession. Malat hemmt vor allem die Aufnahme von Succinat und Glycerin (Kleijn et al., 2010). Die Malat-vermittelte Katabolitrepession ist ebenso von CcpA/Hpr abhängig (Meyer et al., 2011). Auch andere Energiesubstrate zeigen gegenüber energetisch ungünstigeren Substraten Katabolitrepession, wodurch eine hierarchische Nutzung der Substrate bewerkstelligt wird (Singh et al., 2008).

E. coli und *B. subtilis* sind fakultativ anaerobe Mikroorganismen. Die Energiekonservierung erfolgt daher sowohl durch aerobe Atmung als auch durch anaerobe Atmung oder Gärung. Da sich die Energieausbeute verschiedener Elektronenakzeptoren unterscheidet, wird deren Verwendung hierarchisch reguliert. Die Wahl des Elektronenakzeptors richtet sich dabei nach dessen Redoxpotential. Sauerstoff ist mit einem Redoxpotential von $E_0' = +0,82V$ der bevorzugte Elektronenakzeptor, durch welchen anaerobe Stoffwechselwege reprimiert werden. Im aeroben Elektronentransport unterscheiden sich *E. coli* und *B. subtilis* hinsichtlich der terminalen Oxidase zur Reduktion von Sauerstoff. *E. coli* ist nicht im Besitz einer Cytochrom-c-Oxidase und daher oxidasenegativ. Die aerobe Atmungskette von *B. subtilis* hingegen verfügt über einen Chinoloxidase- sowie einen Cytochrom-c-Oxidase-Zweig (Winstedt und Wachenfeldt, 2000). Unter Anaerobiose können *E. coli* und *B. subtilis* Nitrat ($E_0' = +0,43V$) als Elektronenakzeptor verwenden und Nitratammonifikation betreiben. *E. coli* verwendet zusätzlich Fumarat ($E_0' = +0,03V$), DMSO oder TMAO in der anaeroben Elektronentransportkette. In Abwesenheit externer Elektronenakzeptoren konservieren *E. coli* und *B. subtilis* Energie durch Substratkettenphosphorylierung in der Gärung. Beide Bakterien können gemischte Säuregärung betreiben, wobei sich die Zusammensetzung der Produkte unterscheidet. In *E. coli* sind weitere Gärungstypen wie zum Beispiel die Citratfermentation bekannt (Lütgens und Gottschalk, 1980).

Die hierarchische Nutzung der Elektronenakzeptoren wird auf transkriptioneller Ebene durch eine Kombination von Genregulatoren bewerkstelligt, die als Aktivatoren und als Repressoren wirken können. Die molekularen Grundlagen der Regulation sind in *E. coli* gut charakterisiert. Als Hauptregulator der aeroben Atmung dient das Zweikomponentensystem ArcBA (Iuchi und Lin, 1992). In Abwesenheit von Sauerstoff ist dieses an der Repression der Gene des aeroben Elektronentransports sowie des Citratzyclus beteiligt. Die Gene des anaeroben Stoffwechsels werden hauptsächlich durch das Einkomponentensystem FNR reguliert (Shaw und Guest, 1982; Unden und Trageser, 1991). Dieses dient als Aktivator vieler Gene der anaeroben Atmung, wie zum Beispiel der Fumarat- oder Nitratatmung. Die Gene der Fumaratatmung werden bei Anwesenheit von C_4 -Dicarbonsäuren zusätzlich durch das Zweikomponentensystem DcuSR induziert (Zientz et al., 1998). Die Zweikomponentensysteme NarXL und NarQP stimulieren bei Anwesenheit von Nitrat oder

Nitrit die Gene der Nitratatmung, während die Gene alternativer Elektronenakzeptoren und jene der Fermentation reprimiert werden (Stewart, 1993; Rabin und Stewart, 1993).

B. subtilis verfügt über ein FNR-Homolog, welches im Gegensatz zu jenem aus *E. coli* nicht konstitutiv exprimiert wird. Die Induktion von *fnr* erfolgt bei Abwesenheit von Sauerstoff vermutlich durch das Zweikomponentensystem ResDE (Nakano et al., 1996). FNR wiederum induziert die Synthese der Nitratreduktase NarGHJI sowie des Nitrat/Nitrit-Antiporters NarK. Expressionstests in *fnr*-Mutanten deuten darauf hin, dass das Protein außerdem die Expression des Regulators ArfM stimuliert (Marino et al., 2001). ArfM ist vermutlich für die Induktion der für die Gärung essentiellen Gene verantwortlich. Bei Anwesenheit von Nitrat erfolgt die Repression der Strukturgene für die gemischte Säuregärung wahrscheinlich durch den Redoxregulator Rex (Reents et al., 2006). Dieser erkennt Nitrat möglicherweise indirekt über den Redoxstatus der Zelle. Dabei fungiert der durch die Nitratatmung sinkende NADH/NAD⁺-Spiegel wahrscheinlich als Signal für Rex.

2. 2 Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels in *E. coli* und *B. subtilis*

Bei der Anpassung der Bakterienzelle an verschiedene Umweltbedingungen wie Änderung der Temperatur, des pH-Wertes oder des Substratangebotes spielen Zweikomponentensysteme eine wichtige Rolle. Sie bestehen meist aus einer membranständigen Sensorhistidinkinase, die der Reizperzeption dient, und einem cytosolischen Response-Regulator, der als Transkriptionsfaktor die Expression der entsprechenden Zielgene reguliert (West und Stock, 2001). Die Sensoren werden auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten in verschiedene Familien untergliedert (Janausch et al., 2002b; Scheu et al., 2010). Diese sind unter anderem die CitA-, NtrB- und FixL-Familie.

Regulation des aeroben und anaeroben C₄-Dicarboxylatstoffwechsels in *E. coli*

In *E. coli* erfolgt die Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels durch das Zweikomponentensystem DcuSR (Dcu = Dicarcarylate uptake) (Zientz et al., 1998). Die Sensorkinase DcuS gehört zur CitA-Familie von Sensorhistidinkinasen. Diese sind durch zwei Transmembranhelices in der Membran verankert. Die Reizdetektion erfolgt über eine periplasmatische PAS (= Per Arrt Sim)-Domäne, die zwischen den Membranhelices lokalisiert ist (Janausch et al., 2002a, Kneuper et al., 2005, Etzkorn et al., 2008). Im Cytoplasma befinden sich eine weitere PAS-Domäne sowie eine Kinasedomäne. Nach Erkennung der C₄-Dicarbonsäuren sowie der C₆-Tricarbonsäure Citrat durch die periplasmatische PAS -Domäne von DcuS wird das Signal über die Membran in die Zelle weitergeleitet. Dort kommt es in der Kinasedomäne von DcuS zur Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes. Die Phosphatgruppe wird auf einen konservierten Aspartatrest des Response-Regulators DcuR

übertragen. Dieser liegt nun in der aktiven Form vor und bindet durch ein Helix-turn-Helix DNA-Bindemotiv als Transkriptionsfaktor an die Promotoren der Zielgene. Unter aeroben Bedingungen wird die Expression des C₄-Dicarboxylat Transporters DctA stimuliert (Abb. 1). Dieser ist für den protonengekoppelten Symport von C₄-Dicarbonsäuren in die Zelle verantwortlich (Kay und Kornberg, 1969; Davies et al., 1999). Dies ermöglicht eine vollständige Oxidation der C₄-Dicarbonsäuren im Citratzyklus.

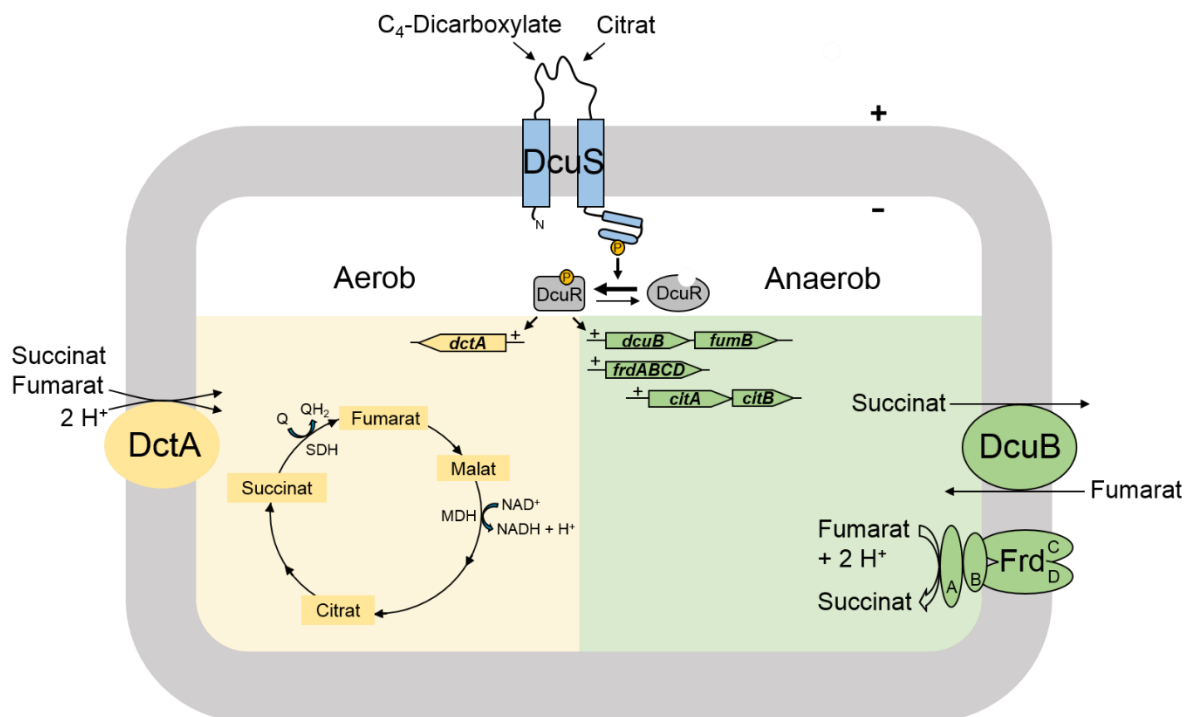


Abb. 1: **Der C₄-Dicarboxylatstoffwechsel in *E. coli*.** Das Zweikomponentensystem DcuSR ist für die Erkennung der C₄-Dicarbonsäuren sowie Citrat und Induktion der Zielgene verantwortlich. Unter Aerobiose wird die Expression des Transporters DctA induziert und die C₄-Dicarbonsäuren werden im Citratzyklus vollständig oxidiert. Unter anaeroben Bedingungen wird die Expression der Gene der Fumaratatmung aktiviert.

Unter Anaerobiose induziert DcuSR die Expression der Gene des Fumarat/Succinat-Antiporters DcuB (*dcuB*), der Fumaratreduktase FrdABCD (*frdABCD*) sowie der Fumarase B (*fumB*) (Abb. 1). Dadurch ist *E. coli* bei alleiniger Anwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren zur Fumaratatmung befähigt. Des Weiteren aktiviert DcuSR die Expression des Zweikomponentensystems CitAB (Scheu et al., 2012). Durch CitAB erfolgt die Induktion des für die Citratfermentation essentiellen Citrat/Succinat-Antiporters CitT sowie der Citratlyase CitCDEFXG (Yamamoto et al., 2008). Zur Expression der für die Citratfermentation notwendigen Enzyme Fumaratreduktase und Fumarase B ist die Citrat-vermittelte Induktion der entsprechenden Gene durch DcuSR notwendig. Dadurch besteht ein physiologischer Zusammenhang der Stoffwechselregulation durch DcuSR und CitAB (Scheu et al., 2012).

Das Bindeprotein-abhängige DctSR-System aus *B. subtilis*

B. subtilis verwendet C₄-Dicarbonsäuren im aeroben Stoffwechsel als Energie- und Kohlenstoffquelle, besitzt jedoch im Gegensatz zu *E. coli* nicht die Fähigkeit zur anaeroben Fumaratatmung oder Citratfermentation. Die Regulation des aeroben C₄-Dicarboxylatstoffwechsels erfolgt in *B. subtilis* durch die Zweikomponentensysteme DctSR und MalKR (Asai et al., 2000; Doan et al., 2003; Tanaka et al., 2003). Die Sensoren DctS sowie MalK gehören wie DcuS aus *E. coli* zur CitA-Familie von Sensorhistidinkinasen (Scheu et al., 2010). Das DctSR-System dient zur Detektion von Fumarat und Succinat und nachfolgender Induktion von *dctA* (Asai et al., 2000; Abb. 2). DctA ist homolog zu dem gleichnamigen aeroben C₄-Dicarboxylat Transporter aus *E. coli* und katalysiert den Symport von Succinat und Fumarat mit 3 Protonen (Groeneveld et al., 2010). Die Expression von *dctA* unterliegt der CcpA/HPr-abhängigen Katabolitrepresion in Anwesenheit von Glucose oder Malat (Fujita, 2009; Meyer et al., 2011). Für die Detektion von Malat ist das Zweikomponentensystem MalKR verantwortlich (Doan et al., 2003; Tanaka et al., 2003). Der Response-Regulator MalR aktiviert in Anwesenheit von Malat die Expression der potentiellen Malat-Transporter YfIS und MaeN sowie des Malatenzym MaeA.

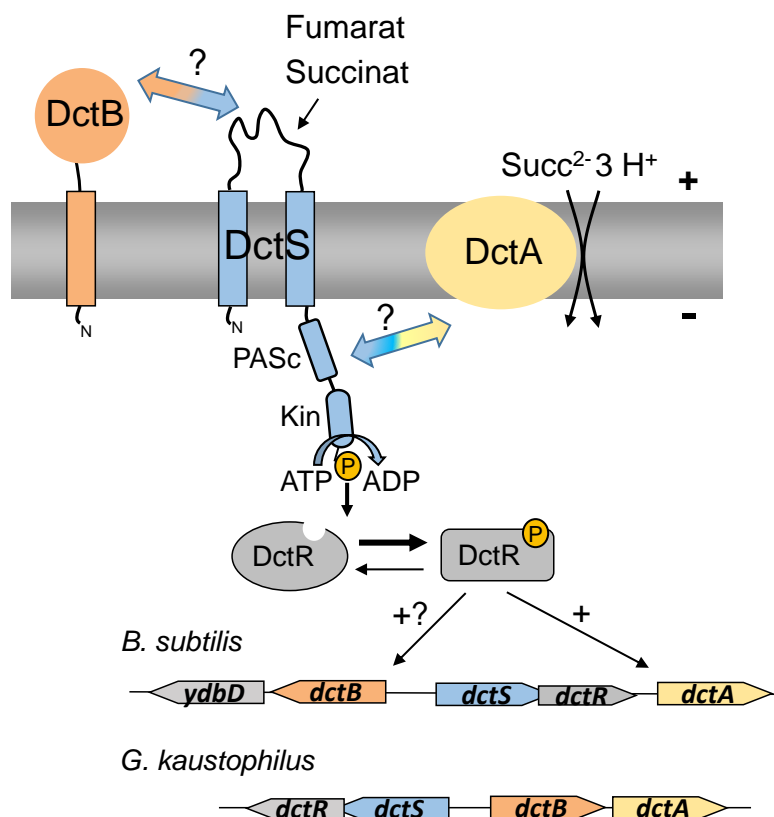


Abb. 2: **Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels in *B. subtilis*.** Unter Aerobiose erkennt das Zweikomponentensystem DctSR die C₄-Dicarbonsäuren Fumarat und Succinat und induziert die Expression von DctA und vermutlich des Bindeproteins DctB. Das thermophile Bakterium *G. kaustophilus* verfügt über ein zu DctSR homologes Zweikomponentensystem.

Im DcuSR-System aus *E. coli* besitzen die C₄-Dicarboxylat Transporter DctA und DcuB neben ihrer Transportfunktion eine Funktion als Cosensoren für die Sensor kinase DcuS (Witan et al., 2012a; 2012b). Unter Aerobiose interagiert die cytoplasmatische Helix 8b von DctA mit DcuS. In Abwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren führt diese Interaktion zur Hemmung der DcuS-Aktivität, wodurch die Expression der Zielgene inhibiert wird (Witan et al., 2012a). Das Fehlen von DctA führt zu einer konstitutiven Expression der Zielgene. In *B. subtilis* führt die Abwesenheit von DctA zu einer stark erhöhten Expression des Zielgens *dctA* (Asai et al., 2000). Dies weist auf eine mögliche Cosensor-Rolle von DctA für DctS aus *B. subtilis* hin (Abb. 2).

Die Funktionalität des DctSR-Systems in *B. subtilis* ist abhängig von einem extrazellulären Bindeprotein (Asai et al., 2000). Dieses wird als DctB bezeichnet und ist vermutlich über eine α -Helix in der Membran verankert (Abb. 2). Die zu *dctSR* benachbarte Genlokalisierung lässt auf eine mögliche Regulation der *dctB*-Expression durch das Zweikomponentensystem schließen (Abb. 2). Mutationsanalysen zeigen, dass die Induktion von *dctA* die Anwesenheit von DctB benötigt (Asai et al., 2000). Für den DctA-abhängigen Transport von Succinat wird DctB nicht benötigt (Schmieden, 2013). Daher ist eine Cosensor-Funktion von DctB für die Sensor kinase DctS wahrscheinlich (Abb. 2). DctB besitzt 37 %ige Sequenzidentität zu DctP aus *Rhodobacter capsulatus*. Dieses ist eine Komponente des TRAP (Tripartite ATP-independent periplasmic)-Transportsystems. Diese Transporter sind sekundär aktiv, verfügen aber wie die primär aktiven ABC-Transporter über ein Substratbindeprotein (DctP), welches das Substrat dem Transporter zuführt (Kelly und Thomas, 2001).

Das thermophile Bakterium *Geobacillus kaustophilus* verfügt über ein zu DctSR homologes Zweikomponentensystem. Dieses besitzt wie *B. subtilis* Gene, welche für einen potentiellen DctA-Transporter sowie ein DctB-Bindeprotein kodieren (Abb. 2). Das DctB-Protein aus *G. kaustophilus* besitzt ebenfalls Sequenzhomologie zu DctP aus *R. capsulatus*. Interessanterweise scheint das *dctB*-Gen in *G. kaustophilus* im Gegensatz zu jenem aus *B. subtilis* mit dem *dctA*-Gen kolokalisiert zu sein (Abb. 2). Die Sensor kinase DctS aus *G. kaustophilus* (DctS_{Gk}) gehört wie DctS aus *B. subtilis* (DctS_{Bs}) zur CitA-Familie von Sensorhistidinkinasen. Nach heterologer Expression in *E. coli* zeigt DctS_{Gk} Komplementation der DcuS-Funktion (Graf, 2009).

2.3 Bindeproteine in Transport- und in Signaltransduktionssystemen

Extrazelluläre Bindeproteine, auch ESR (Extracelluläre solute receptor) genannt, sind schon lange bekannt als essentielle Komponenten in Transportsystemen von ABC-Transportern (Berger, 1973; Tam und Saier, 1993; Wilkinson, 2002). ABC-Transporter sind primär aktive Carrier, bei welchen ein extrazelluläres Bindeprotein für die Ligandenbindung verantwortlich ist (Abb. 3). ESR-Proteine sind auch in anderen Transportsystemen sowie in bakteriellen Zweikomponentensystemen weit verbreitet (Berntsson et al., 2010). In gramnegativen Bakterien diffundieren diese frei im Periplasma, während die Bindeproteine grampositiver Bakterien meist als Lipoprotein oder über eine Transmembranhelix in der Membran verankert sind. ESR-Bindeproteine zeigen untereinander geringe oder keine Sequenzhomologien. Hohe Sequenzhomologien sind nur zwischen ESR-Proteinen zu finden, die für die Bindung des gleichen Liganden verantwortlich sind. Strukturell sind ESR-Bindeproteine jedoch hochkonserviert und basierend auf Strukturvergleichen können sie in 6 verschiedene Cluster unterteilt werden (Berntsson et al., 2010). ESR-Proteine bestehen aus 2 globulären Domänen, die durch eine Scharnierregion miteinander verbunden sind. Die Ligandenbindung erfolgt in einer Spalte zwischen den beiden Domänen.

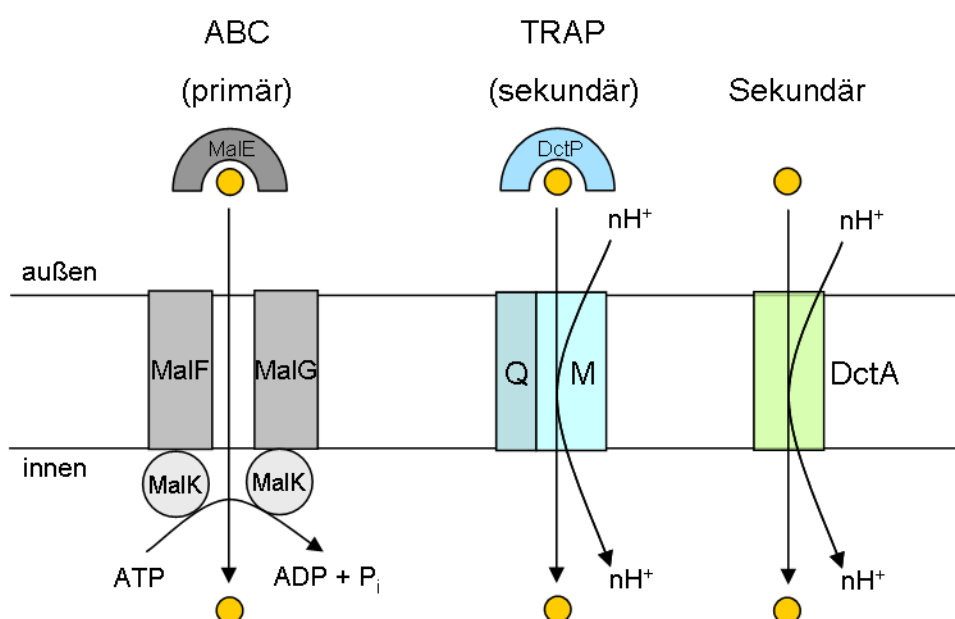


Abb. 3: **Vergleich von Transportern des TRAP-Typs mit typischen sekundären Carriern und ABC-Transportsystemen.** Transporter des TRAP-Typs sind sekundär aktiv, die wie die typischen sekundären Carrier den Transport der Substrate mit dem Import von Protonen oder anderen Kationen koppeln. Anders als in typischen sekundären Carriern ist der Transport abhängig von einem extrazellulären Bindeprotein wie es auch in den primär aktiven ABC-Transportern vorkommt. ABC-Transporter koppeln im Gegensatz zu den sekundären Carriern den Transport der Substrate mit der Hydrolyse von ATP. Der jeweilige Transport-Typ ist exemplarisch an dem Maltose-ABC-Transporter aus *E. coli*, dem für C₄-Dicarbonsäuren spezifischen TRAP-Transporter aus *R. capsulatus* und dem C₄-Dicarbonsäure-Carrier DctA aus *E. coli* dargestellt.

Eine weitere Klasse von Transportern, die ein ESR-Bindeprotein zur Ligandenbindung verwenden sind die sekundär aktiven Transportsysteme des TRAP- (Tripartite ATP-independent periplasmic) und des TTT (Tripartite Iricarboxylate Transporter)-Typs (Mulligan et al., 2011; Winnen et al., 2003). Sie unterscheiden sich von klassischen sekundären Transportern in der Anwesenheit des Bindeproteins sowie im Aufbau des Transporters (Abb. 3). Sie sind dreigliedrig aufgebaut und bestehen aus je einem Bindeprotein und zwei Membrankomplexen, die die Membran mit 4 bzw. 12 Helices durchspannen. Auf Grund fehlender Sequenzhomologie zwischen den TRAP- und TTT-Transportern werden diese in zwei Familien unterteilt. Bindeproteine von TRAP-Transportsystemen werden weiterhin in zwei Subfamilien unterteilt. Diese sind zum einen die Bindeproteine des DctP-Typs und die des TAXI-TRAP Typs, wobei letztere Bindeproteine in Archaeen darstellen.

Bindeproteine des DctP-Typs zeigen Sequenzhomologie zu DctP aus *Rhodobacter capsulatus* (Mulligan et al., 2011). DctP aus *R. capsulatus* ist das als erstes charakterisierte TRAP-Bindeprotein (Hamblin et al., 1990, 1993; Shaw et al., 1991, Walmsley et al., 1992a, 1992b; Forward et al., 1993, 1997). Dieses ist Bestandteil des hochaffinen DctPQM-Transportsystems für die Aufnahme von C₄-Dicarbonsäuren (Abb. 3). Die Membrankomponenten werden als DctQ (4 Transmembranhelices) und DctM (12 Transmembranhelices) bezeichnet. Die Liganden von Bindeproteinen des DctP-Typs zeigen Übereinstimmung im Vorhandensein mindestens einer Carboxylgruppe. Neben C₄-Dicarbonsäuren sind typische Liganden zum Beispiel α -Ketosäuren, N-Acetylneuraminsäuren oder Monocarbonsäuren (Fischer et al., 2010). Bisher sind die Kristallstrukturen von sieben DctP-Typ Bindeproteinen aufgeklärt (Fischer et al., 2010). Auf Grund der sehr ähnlichen Tertiärstruktur werden sie in ein Cluster von ESR-Proteinen eingeordnet (Berntsson et al., 2010). Ein Charakteristikum von DctP-Typ Bindeproteinen ist das Vorhandensein einer langen α -Helix, die Bestandteil beider Domänen ist und als Scharnier für die Ligandenbindung fungiert (Fischer et al., 2010; Berntsson et al., 2010). Für die Ligandenbindung ist die Bildung einer Salzbrücke zwischen einer Carboxylgruppe des Liganden und einem konservierten Argininrest essentiell (Fischer et al., 2010).

ESR-Bindeproteine, die eine Rolle als Cosensoren in Signaltransduktionssystemen spielen, sind zum Beispiel das Bindeprotein LuxP aus *Vibrio harveyi* oder ChvE aus *Agrobacterium tumefaciens*. LuxP ist für die Erkennung des Signalmoleküls Autoinducer 2 verantwortlich, welches beim Quorum sensing in Bakterien eine wichtige Rolle spielt. Zur Signaltransduktion interagiert LuxP mit der Sensorkinase LuxQ (Neiditch et al., 2005, 2006). Das Bindeprotein ChvE ist Mitglied der PSBP (periplasmic sugar binding proteins)-Familie und interagiert mit der Sensorkinase des Zweikomponentensystems VirA/VirG, welches in *A. tumefaciens* die Expression von Virulenzgenen induziert (He et al., 2009).

Einige Bindeproteine spielen sowohl im Transport als auch bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. In *Bordetella pertussis* erfolgt die Erkennung von Citrat durch das Bindeprotein BctC, welches zur Signaltransduktion mit der Sensorkinase BctE interagiert (Antoine et al., 2005). Gleichzeitig ist BctC jedoch auch Teil des TTT-Transportsystems BctCBA und ist wahrscheinlich für die Zufuhr des Liganden zu den BctBA-Transporteinheiten verantwortlich. Das Bindeprotein MalE ist Teil des ABC-Transporters zur Aufnahme von Maltose in *E. coli*. Außerdem spielt MalE eine Rolle bei der Chemotaxis, indem es mit dem MCP-Protein (Methyl-acepting Chemotaxis Protein) Tar (Taxis to aspartate and some repellents) interagiert (Gardina et al., 1998).

2.4 Das DctSRPQM-System aus *Rhodobacter capsulatus*

Rhodobacter capsulatus ist gramnegativ und zählt zu den Nichtschwefel-Purpurbakterien. Diese können unter anaeroben Bedingungen Photosynthese betreiben und sind unter Aerobiose zu heterotrophem Wachstum befähigt. Bevorzugte Kohlenstoffquellen bei aerobem Wachstum sind unter Anderem die C₄-Dicarbonsäuren Malat und Succinat (Stahl und Sojka, 1973). Zur Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels verfügt *R. capsulatus* über ein DctSR-Zweikomponentensystem, welches die Expression eines hochaffinen TRAP-Transportsystems reguliert (Hamblin et al., 1993, Forward et al., 1997, Abb. 4).

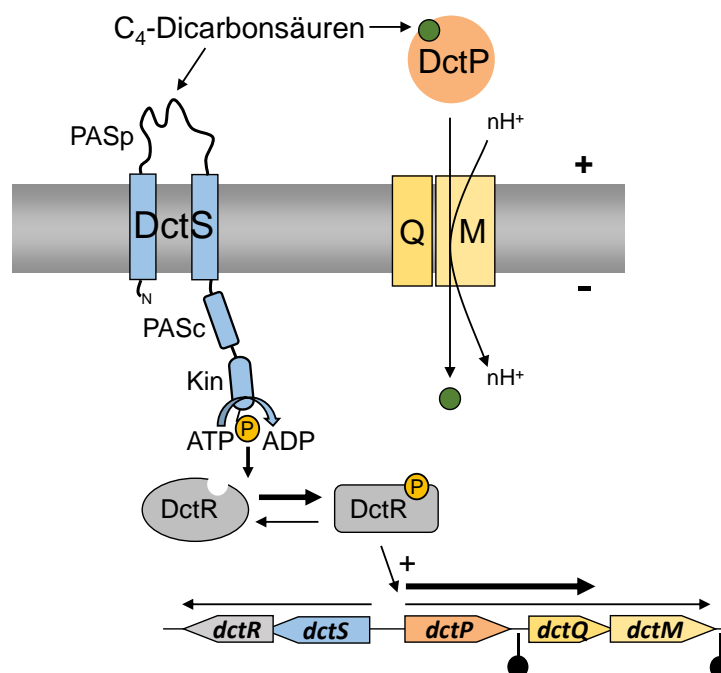


Abb. 4: **Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels in *R. capsulatus*.** Das Zweikomponentensystem DctSR induziert bei Anwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren die Expression des hochaffinen TRAP-Transporters DctPQM zur Aufnahme der Substrate in die Zelle. Eine partielle Transkriptionstermination im Intergenbereich zwischen *dctP* und *dctQM* sorgt für ein stärkeres Expressionslevel von *dctP*. ↓ : Transkriptionstermination.

Das als DctPQM bezeichnete Transportsystem sorgt für die Aufnahme der C₄-Dicarbonsäuren L-Malat, Fumarat, Succinat und D-Malat (Walmsley et al., 1992a, Forward et al., 1997). Das Bindeprotein DctP ist eine essentielle Komponente des Transportsystems und für die hochaffine Bindung der C₄-Dicarbonsäuren sowie die Weitergabe an die Transporter-Einheiten DctQ und DctM verantwortlich. Der apparente K_D-Wert von DctP liegt je nach Substrat zwischen 0,05 µM und 6,3 µM (Walmsley et al., 1992a). Es besitzt die höchste Affinität zu L-Malat, gefolgt von Succinat, Fumarat und D-Malat. DctP verfügt über eine N-terminale Signalsequenz für den Export des Proteins in das Periplasma der Zelle (Shaw et al., 1991). Das entsprechende Gen *dctP* ist in einem Operon mit den Transportgenen *dctQM* kodiert (Abb. 4). Die Expression des *dctPQM*-Operons wird durch DctSR und C₄-Dicarbonsäuren induziert (Hamblin et al., 1993). Eine partielle Transkriptionstermination im Intergenbereich zwischen *dctP* und *dctQM* führt zu deutlich geringerer Expression der Transporter-Einheiten DctQM im Vergleich zur Expressionsstärke von DctP (Hamblin et al., 1993; Kelly und Thomas, 2001).

Der Transport der C₄-Dicarbonsäuren erfolgt durch die Membrankomponenten DctQM und ist abhängig vom Protonenpotential (Forward et al., 1997). DctM gehört zur Superfamilie der Ionentransporter und besteht wahrscheinlich wie diese aus 12 Transmembranhelices. DctM besitzt Ähnlichkeiten zur DcuC-Familie von C₄-Dicarboxylattransportern (Mulligan et al., 2011). Sehr wahrscheinlich bildet die DctM-Komponente den Kanal für den Transport des Substrats in die Zelle. DctQ besteht wahrscheinlich aus 4 Transmembranhelices und ist möglicherweise für die Interaktion mit dem Bindeprotein DctP essentiell (Mulligan et al., 2011). Nach heterologer Expression in *E. coli* ist DctQM in der Membranfraktion lokalisiert (Forward et al., 1997).

Die Sensorkinase DctS aus *R. capsulatus* besitzt eine Domänenorganisation, die typisch ist für die CitA-Familie von Sensorhistidinkinasen (Abb. 4). Das DctSRPQM-System zeigt Komplementation der Funktion des Zweikomponentensystems DctBD sowie des Transporters DctA aus *Rhizobium meliloti* (Forward et al., 1997). Das Zweikomponentensystem DctBD ist in *R. meliloti* für die Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels verantwortlich (Ronson, 1988; Yarosh et al., 1989; Jording et al., 1993; Reid und Poole, 1998). Es kontrolliert die Expression des sekundären Transporters DctA.

2.5 Ziele dieser Arbeit

In *B. subtilis* lagen aus genetischen Untersuchungen (Asai et al., 2000) Hinweise vor, dass das C₄-Dicarboxylat-Sensorsystem DctSR das Bindeprotein DctB, möglicherweise aber auch den Transporter DctA als Cosensor benötigt. Die Sensorkinase DcuS in *E. coli* benötigt die C₄-Dicarboxylat-Transporter DctA unter aeroben und DcuB unter anaeroben Bedingungen als Cosensoren (Witan et al., 2012a, 2012b). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob C₄-Dicarboxylat-Sensorsysteme nur in *E. coli* oder auch in anderen Bakterien Hilfsproteine für ihre Funktion benötigen, und ob als solche nur Transporter oder auch andere Proteine in Frage kommen.

Es sollte ein direkter Nachweis geführt werden, ob DctB und DctA aus *B. subtilis* gemeinsam oder nur jeweils eine der Komponenten als Cosensoren für DctS fungieren. Für die Untersuchung wurden *in vivo* Interaktionsstudien eingesetzt, durch welche bei Interaktion der Membranproteine eine Co-Reinigung mittels Affinitätschromatographie erfolgt. Diese Methode wird je nach Affinitätssäule als mSPINE oder mHPINE (Membrane Strep/His-Protein Interaction Experiment) bezeichnet. Als weitere unabhängige Methode zur Bestimmung der Proteininteraktion wurde das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System angewandt. Das Bindeprotein DctB besitzt Homologie zu DctP aus dem TRAP-Transportsystem von *R. capsulatus*, fungiert jedoch im Gegensatz zu DctP wahrscheinlich als Cosensor. Durch Transportmessungen mit [¹⁴C]-Succinat sollte gezeigt werden, ob das Bindeprotein DctB außerdem eine Rolle für den DctA-vermittelten Transport spielt.

Zweikomponentensysteme mit Homologie zu DcuSR aus *E. coli* (DcuSR_{Ec}) und DctSR (DctSR_{Bs}) aus *B. subtilis* sind auch in thermophilen Bakterien zu finden (Graf, 2009). Es sollte untersucht werden, ob Zweikomponentensysteme des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels aus anderen Bakteriengruppen nach einem ähnlichen Schema wie DcuSR_{Ec} bzw. DctSR_{Bs} aufgebaut sind. Dafür wurde das DctSR-System aus *Geobacillus kaustophilus* näher charakterisiert. Der Sensor DctS aus *Geobacillus kaustophilus* (DctS_{Gk}) zeigt nach heterologer Expression in *E. coli* Komplementation der DcuS-Funktion. Die Expression des Reportergens *dcuB-lacZ* wird mit DctS_{Gk} in Abhängigkeit von Fumarat gesteigert. In dieser Arbeit sollte das Substratspektrum von DctS_{Gk} mittels der Reportergene *dcuB-lacZ* und *dctA-lacZ* näher charakterisiert werden. Des Weiteren wurde die Kinaseaktivität von DctS_{Gk} nach Rekonstitution in *E. coli* Phospholipide untersucht.

3 Material und Methode

3.1 Verwendete Stämme und Plasmide von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*

Tab. M1: Verwendete Stämme und Plasmide von *E. coli* und *B. subtilis*

Stamm oder Plasmid	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> K12 Stämme		
BTH101	Reporterstamm <i>cya</i> Two-Hybrid System, Rec ⁺ ; <i>F</i> , <i>cya</i> -99, <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., 1998
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_Bgal1</i> , <i>dcm</i> λDE3, mit IPTG-induzierbarer chromosomaler T7-RNA-Polymerase; Proteinüberproduktionsstamm	Studier und Moffat, 1986
C43(DE3)	spontane Mutation von BL21(DE3) zur Expression von Membranproteinen	Miroux und Walker, 1996
IMW260	MC4100, λ[Φ(<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i>)hyb, <i>amp</i> ^r], Δ <i>lacZ</i> ; <i>dcuS</i> :: <i>cam</i> ^r	Zientz et al., 1998
IMW385	MC4100, λ[Φ(<i>dctA</i> '-' <i>lacZ</i>)hyb, <i>amp</i> ^r]	Kleefeld, 2002
IMW389	P1 (IMW260) x (IMW385), <i>dcuS</i> :: <i>cam</i> ^r , λ(Φ <i>dctA</i> '-' <i>lacZ</i>), hyb, <i>amp</i> ^r	Kleefeld, 2002
IMW538	P1 (MDO800) x (IMW389), <i>dctA</i> :: <i>spec</i> ^r , <i>dcuS</i> :: <i>cam</i> ^r , γ(Φ <i>dctA</i> '-' <i>lacZ</i>)	Kleefeld, 2006
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>), <i>F</i> '[<i>traD36 proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>]	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
MG1655	CGSC 6300, <i>fnr</i> , λ-F-P1-sensitiv	Jensen, 1993
XL1-Blue	Stamm zur gerichteten Mutagenese, <i>F</i> , <i>recA1</i> -, (<i>mk</i> +, <i>rk</i> -) <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>thi</i> -1, λ-, <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , (<i>lac</i> -) [<i>F</i> -, <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q , <i>Z</i> Δ <i>M15</i> <i>Tn10</i> (<i>tet</i> ^r)]	Stratagene
<i>E. coli</i> Plasmide für LFH-PCR und <i>B. subtilis</i> Stammkonstruktion		
pAC7	Vektor für Konstruktion von translationalen <i>lacZ</i> -Fusionen in <i>B. subtilis</i> , wird nicht in <i>B. subtilis</i> repliziert, <i>kan</i> ^r	Weinrauch et al., 1991
pMW1475	<i>dctA-lacZ</i> Reporterfusion in pAC7, für Transformation der Fusion in <i>B. subtilis</i> , wird nicht in <i>B. subtilis</i> repliziert, <i>kan</i> ^r	Diese Arbeit

Stamm oder Plasmid	Genotyp	Referenz
pMW1605	<i>dctB-lacZ</i> Reporterfusion in pAC7, für Transformation der Fusion in <i>B. subtilis</i> , wird nicht in <i>B. subtilis</i> repliziert, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pDG1726	Plasmid mit <i>spec^r</i> für LFH-PCR	Guerout-Fleury et al., 1995
pGEM-cat	Plasmid mit <i>cam^r</i> für LFH-PCR	Youngman, 1990
<i>E. coli/B. subtilis</i> Shuttleplasmide		
pBQ200	Expressionsplasmid mit konstitutivem <i>degQ^h</i> -Promotor, <i>amp^r</i> in <i>E. coli</i> ; <i>ery^r</i> in <i>B. subtilis</i>	Martin-Verstraete et al., 1994
pHT304	Expressionsplasmid, enthält keinen Promotor und keine Ribosomenbindestelle, <i>amp^r</i> in <i>E. coli</i> , <i>ery^r</i> in <i>B. subtilis</i>	Arantes und Lereclus, 1991
pMW1482	Expression von His ₆ -DctS _{GK} (Swissprot Q5L2I6), pBQ200 Derivat, Ribosomenbindestelle aus <i>gapA_{BS}</i> , <i>amp^r</i> in <i>E. coli</i> , <i>ery^r</i> in <i>B. subtilis</i>	Diese Arbeit
pMW1558	Expression von DctS _{BS} mit eigenem Promotor und eigener Ribosomenbindestelle, pHT304 Derivat, <i>amp^r</i> in <i>E. coli</i> , <i>ery^r</i> in <i>B. subtilis</i>	Diese Arbeit
pMW1609	Expression von DctSR _{BS} mit eigenem Promotor und eigener Ribosomenbindestelle, pHT304 Derivat, <i>amp^r</i> in <i>E. coli</i> , <i>ery^r</i> in <i>B. subtilis</i>	Diese Arbeit
pMW1927	Expression von DctA _{BS} -His ₆ , pBQ200 Derivat, Ribosomenbindestelle aus <i>gapA_{BS}</i> , <i>amp^r</i> in <i>E. coli</i> , <i>ery^r</i> in <i>B. subtilis</i>	Schmieden, 2013
<i>B. subtilis</i> 168 Stämme und Plasmide		
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	Laborstamm
IMW595	<i>dctS::cam^r</i> , über LFH-PCR eingebracht	Diese Arbeit
IMW597	<i>B. subtilis</i> 168 mit einer <i>dctA-lacZ</i> Reporterfusion (in <i>amyE</i> -Lokus), durch Transformation des linearisierten pMW1475, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
IMW598	IMW595 mit einer <i>dctA-lacZ</i> Reporterfusion (in <i>amyE</i> -Lokus), durch Transformation des linearisierten pMW1475, <i>kan^r</i> , <i>cam^r</i>	Diese Arbeit

Stamm oder Plasmid	Genotyp	Referenz
IMW599	<i>B. subtilis</i> 168 mit einer <i>dctB-lacZ</i> Reporterfusion (in <i>amyE</i> -Lokus), durch Transformation des linearisierten pMW1605, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
IMW600	IMW595 mit einer <i>dctB-lacZ</i> Reporterfusion (in <i>amyE</i> -Lokus), durch Transformation des linearisierten pMW1605, <i>kan^r</i> , <i>cam^r</i>	Diese Arbeit
IMW610	<i>dctB::spec^r</i> , über LFH-PCR eingebracht	Schmieden, 2013
Geobacillus Stämme		
<i>G. kaustophilus</i> HTA426	Wildtypstamm	Takami et al., 2004
<i>G. kaustophilus</i> DSM7263	Wildtypstamm	Nazina et al., 2001
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM465	Wildtypstamm	Nazina et al., 2001
E. coli Expressionsplasmide		
pET28a	Expressionsvektor für Fusionen mit N- und/oder C-terminalem His ₆ -tag, T7-Promotor, pBR322 ori, <i>kan^r</i>	Novagen
pMW180	Expression von His ₆ -DcuR, pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Janausch et al., 2004
pMW817	Expression von His ₆ -DctS _{Gk} (Swissprot Q5L2I6), pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Graf, 2009
pMW972	Expression von His ₆ -PhoR _{Gk} (Swissprot Q5KWC0), pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW973	Expression von His ₆ -Res _{Gk} (Swissprot Q5KXM3), pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW960	Expression von His ₆ -CitA _{Gt} (Swissprot A4IPE6), pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW961	Expression von His ₆ -DcuS _{Pt} (Swissprot A5D2L2), pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
Plasmide für DctS_{Gk}/DcuS_{Ec}-Punktmutanten		
pMW181	Expression von His ₆ -DcuS _{Ec} mit eigenem Promotor, pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Janausch et al., 2002a
pMW237	Expression von His ₆ -DcuS _{Ec} R147A, pMW181 Derivat, <i>kan^r</i>	Kneuper et al., 2005
pMW151	Expression von His ₆ -DcuS _{Ec} , pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Janausch et al., 2002a

Stamm oder Plasmid	Genotyp	Referenz
pMW1437	Expression von His ₆ -DctS _{GK} R137A, pMW817 Derivat, <i>kan^r</i>	Rudeck, 2011
pMW1606	Expression von His ₆ -DctS _{GK} R97A, pMW817 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1607	Expression von His ₆ -DctS _{GK} H100A, pMW817 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1608	Expression von His ₆ -DctS _{GK} F139A, pMW817 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1690	Expression von His ₆ -DctS _{GK} R97A+F139A, pMW1606 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1691	Expression von His ₆ -DctS _{GK} H100A+F139A, pMW1607 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1692	Expression von His ₆ -DctS _{GK} H100A+R137A, pMW1607 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
Plasmide für mSPINE und mHPINE		
pASK-IBA3 ⁺	Expressionsvektor für Fusionen mit C-terminalem Strep-Tag, AHT-induzierbarer Promotor, <i>amp^r</i>	IBA, Göttingen
pASK-IBA13 ⁺	Expressionsvektor für Fusionen mit N-terminalem Strep-Tag, AHT-induzierbarer Promotor, <i>amp^r</i>	IBA, Göttingen
pBAD33	Plasmid für die Genexpression unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren pBAD-Promotors, pACYC ori, <i>cam^r</i>	Guzman et al., 1995
pMW1657	Expression von His ₆ -PASc-T25, pKNT25 Derivat, <i>kan^r</i>	Monzel et al., 2013
pMW1788	Expression von DctS _{Bs} -Strep, pASK-IBA3 ⁺ Derivat, <i>amp^r</i>	Diese Arbeit
pMW1789	Expression von Strep-DctS _{Bs} , pASK-IBA13 ⁺ Derivat, <i>amp^r</i>	Diese Arbeit
pMW1790	Expression von His ₆ -DctB, pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1791	Expression von DctB _{Bs} -His ₆ , pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1792	Expression von His ₆ -DctA _{Bs} , pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1793	Expression von DctA _{Bs} -His ₆ , pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1795	Expression von DctB _{Bs} -His ₆ , pBAD33 Derivat, <i>cam^r</i>	Diese Arbeit
pMW1797	Expression von DctA-His ₆ , pBAD33 Derivat, <i>cam^r</i>	Diese Arbeit

Stamm oder Plasmid	Genotyp	Referenz
pMW1974	Expression von DctA _{Bs} -Strep, pASK-IBA3 ⁺ Derivat, <i>amp^r</i>	Diese Arbeit
pMW1975	Expression von DctA-His ₆ und DctB-His ₆ , pMW1795 Derivat, <i>cam^r</i>	Diese Arbeit
pMW1800	Expression von His ₆ -DctP aus <i>A. aromaticum</i> , pET28a Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
Plasmide für BACTH-Messungen		
pKNT25	Plasmid für die Expression von C-terminalen T25-Fusionen, pSU40 Derivat, <i>kan^r</i>	BACTH manual, Karimova et al., 2005
pKT25	Plasmid für die Expression von N-terminalen T25-Fusionen, pSU40 Derivat, <i>kan^r</i>	BACTH manual, Karimova et al., 2005
pUT18	Plasmid für die Expression von C-terminalen T18-Fusionen, pUC19 Derivat, <i>amp^r</i>	BACTH manual, Karimova et al., 2005
pUT18C	Plasmid für die Expression von N-terminalen T18-Fusionen, pUC19 Derivat, <i>amp^r</i>	BACTH manual, Karimova et al., 2005
pKT25-zip	Expression von T25-zip, Leucine-Zipper von GCN4, pKT25 Derivat, <i>kan^r</i>	Karimova et al., 1998
pMW1693	Expression von T25-DctS, pKT25 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1694	Expression von DctS-T25, pKNT25 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1695	Expression von DctS-T18, pUT18 Derivat, <i>amp^r</i>	Diese Arbeit
pMW1696	Expression von T18-DctS, pUT18C Derivat, <i>amp^r</i>	Diese Arbeit
pMW1697	Expression von T25-DctR, pKT25 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1698	Expression von DctR-T25, pKNT25 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1699	Expression von DctR-T18, pUT18 Derivat, <i>amp^r</i>	Diese Arbeit
pMW1700	Expression von T18-DctR, pUT18C Derivat, <i>amp^r</i>	Diese Arbeit
pMW1701	Expression von T25-DctA, pKT25 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1702	Expression von DctA-T25, pKNT25 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit

Stamm oder Plasmid	Genotyp	Referenz
pMW1703	Expression von DctA-T18, pUT18 Derivat, <i>amp^r</i>	Diese Arbeit
pMW1704	Expression von T18-DctA, pUT18C Derivat, <i>amp^r</i>	Diese Arbeit
pMW1705	Expression von T25-DctB, pKT25 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1706	Expression von DctB-T25, pKNT25 Derivat, <i>kan^r</i>	Diese Arbeit
pMW1707	Expression von DctB-T18, pUT18 Derivat, <i>amp^r</i>	Diese Arbeit
pMW1708	Expression von T18-DctB, pUT18C Derivat, <i>amp^r</i>	Diese Arbeit

Tab. M2: Verwendete Oligonucleotide (MWG, Biotech, Ebersberg, HPSF gereinigt)

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
Klonierung in <i>E. coli</i>/B. subtilis Shuttleplasmide		
dctS_Q200_for	TATCTGCAGTTTAAAGGAGGAAACAATCATGCATC ATCATCATCATCACAGCAGCGG	65
dctS_Q200_rev	CTCAGCGGTGGCAGCAGCC	65
dctS_BS_F	TTTGATCCTGCAGGCCTTCC	59
dctS_BS_R	ATCCTTGTCGACCTCTTGAACC	60
dctSR_BS-For	AACACGATTTGATCCTGCAGGCC	62
dctSR_BS-Rev	CATAGTCGACATTTTGGTCTTTTTGG	60
dctA_F	ATATAGGATCCTTTAAAGGAGGAAACAATCATGAA ACTGTTTTAAAAATTTAACAGTTCAGG	60
dctA_R	ATATAGCATGCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGA CTGCTGTTTTCATTTTTTTCATGC	59
Primer für LFH-PCR		
dctS1	TTCGGCATACTGTTTCATTCCACTCCG	60
dctS2	CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGTTGCCGATG AGCACAATGCCGC	61
dctS3	CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGGGCACGAT AGAAGTTGATTCACATGCG	60
dctS4	GTGGTGACAACCTCGAAATAGATAAACGC	60
Seq1	CAGGGTCAAGACGCTTCATCC	56
Seq2	TCCAGTCGATTCCCTGACCGCC	60

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
cat-fwd	CAGCGAACCATTTGAGGTGATAGGCGGCAATAGT TACCCTTATTATCAAG	80,5
cat-rev	CGATACAAATTCCTCGTAGGCGCTCGGCCAGCGT GGACCGGCGAGGCTAGTTACCC	90
dctBBS_up_F	GGCCGCTTCCGTTCTGTCC	63,6
dctBBS_up_R	CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGCCGGTATGA TCATGGAATCCG	64,2
dctBBS_down_F	CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGGCGTCTTG ACCCTGTTTACCG	63
dctBBS_down_R	GGTACGAACCAAACCTGGACGG	63
spec_fwd	CAGCGAACCATTTGAGGTGATAGGGACTGGCTC GCTAATAACGTAACGTGACTGGCAAGAG	86,4
spec_rev	CGATACAAATTCCTCGTAGGCGCTCGGCGTAGCG AGGGCAAGGGTTTATTGTTTTCTAAAATCTG	86
sequ_upstr	ACCGGCGATCGTGTGCAGC	63,6
sequ_downstr	CGAGGAAAACGATCAGAAGGCTG	64,6
Klonierung von Reporterfusionen		
dctA-lacZ_for2	AAAACCGGAATTCTCAAATTGGACG	60
dctA-lacZ_rev	TTTAGGATCCTTCATATCCTTCATCCC	62
ldctB-F	CGCCCTTGAATTCAGAGAAATAAATGTGC	64
ldctB-R	TGCAAGCGGATCCTTCATGAAAAGC	63
Klonierung von DcuS/CitA-Homologen		
dcuS_Pt-for	TAAATCTCATATGCAGAAGGC	54
dcuS_Pt-rev	ACATTTGTGAATTCGCCTCC	55
dcuS_Gt-for	TTTGAGAGGATCCACTATGAAGC	59
dcuS_Gt-for	GCGAATCGTCGACTCTCTATC	60
q5L2I6-Ndel-for	GAGTTCCCATATGAACCGGC	59
q5L2I6-Ndel-rev	GCTGCATGAATTCGTAGTCAC	58
q5KWC0for	CGATACACGAATTCTCGACGTCC	62,4
q5KWC0rev	GATTCATCCCAAGCTTACGCTCAC	62,7
q5KXM3for	CAGTGAGCGACATATGTGGCTG	62
q5KXM3rev	AAGCCGTGAATTCCTCCGCTC	61,4
DctS _{Gk} Punktmutanten		
R97A-For	CTCGATATGAACAAAGTGGCACTCTCCCATCCGC TTCCTG	79

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
R97A-Rev	CAGGAAGCGGATGGGAGAGTGCCACTTTGTTTCAT ATCGAG	79
H100A-For	GAACAAAGTGCGCCTCTCCGCACCGCTTCCTGC GATGATCGG	84
H100A-Rev	CCGATCATCGCAGGAAGCGGTGCGGAGAGGCGC ACTTTGTTTC	84
F139A-For	GGACAGTGGTTCGCGCCGCAGTTCCCATTATG	75
F139A-Rev	CATAATGGGAAGTGCAGGCGCAACCACTGTCC	75
Klonierungen mSPINE/mHPINE		
dctS-pASK-For	TATGGTACCATGAACAAAAAGAAGCTCTCAATCC GTTGG	64
dctS-pASK3-Rev	TATGTGCGACCGAGCCATGCTGTGCTTCCTCC	66
dctS-pASK13-Rev	TATGTGCGACTTACGAGCCATGCTGTGCTTCCTCC	66
N-dctBBs_pET-For	TATCATATGAAGAGTTTGCTTGCATGTCTCGCAC	65
N-dctBBs_pET-Rev	TATGTGCGACCTATGAATCTTTTCGCAGCTCCAACA GTTCC	67
C-dctBBs_pET-For	TATCCATGGTAATGAAGAGTTTGCTTGCATGTCTC GCAC	65
C-dctBBs_pET-Rev	TATAAGCTTTGAATCTTTTCGCAGCTCCAACAGTT CCC	67
N-dctABs_pET-For	TATCATATGAAACTGTTTAAAAATTTAACAGTTCAG G	59
N-dctABs_pET-Rev	TATGAATTCTCAGACTGCTGTTTTCATTTTTTTCAT GC	61
C-dctABs_pET-For	TATCCATGGTAATGAAACTGTTTAAAAATTTAACA GTTCCAGG	59
C-dctABs_pET-Rev	TATGAATTCATGACTGCTGTTTTCATTTTTTTCATG CC	56
pBAD_Umk-For	CACTATAGGGGTACCGTGAGCG	64
pBAD_Umk-Rev	GCTTTGTTAGGTACCGGATCTCAGTGG	67
dctA-1797-F	GAATTCAGGAGATATACCATGGTAATGAAACTG	60
dctA-1797-R	CGGAGCTCGAATTCTATGACTGC	62
Psy-For	CACTTTGCTATGCGACCGGTCTTTATCC	68
Psy-Rev2	GCATTTATCAGGGACCCGGTCTCATGAGC	69,5
DctP2_for	TCACCGGATCCAGGAGAGTAATG	64,6
DctP2_rev	CGTTCAGCGGAATTCATGGATTA	60,9
Klonierungen BACTH		
dctS-BS-2518-F	TATGGATCCGAACAAAAAGAAGCTCTCAATCCG	57

Primer	Sequenz (5' → 3')	T_m [°C]
dctS-BS-2518C-R	ATAGGTACCTTACGAGCCATGCTGTGC	56
dctS-BS-2518N-R	ATAGGTACCTGCGAGCCATGCTGTGCTTC	58
dctR-BS-2518-F	TATGGATCCGATGGCTCGTAAAGAATGGAAGG	58
dctR-BS-2518C-R	ATAGGTACCTTATCCTTTTAAACACGTAGCGG	57
dctR-BS-2518N-R	ATAGGTACCAGTCCTTTTAAACACGTAGCGGTTG	58
dctA-BS-2518-F	TATGGATCCGATGAAACTGTTTAAAAATTTAACAG TTCAGG	59
dctA-BS-2518C-R	ATAGGTACCTCAGACTGCTGTTTTTCATTTTTTTCA TGC	61
dctA-BS-2518N-R	ATAGGTACCAGGACTGCTGTTTTTCATTTTTTTTCAT GC	59
Amplifikation von Promotorbereichen		
dcuB_for	TACTCACTACTGAAACAATA	50
dcuB_for	TGGATAGTAAATAACATGTG	50
citAB_for	AGGCGAGGTTTATCAATTCAG	57,5
citAB_rev	TCTCGTTAAGCTGCAACATTG	57,5
dcuS_for	AGTAGCGCCTGATCCATGAC	60,5
dcuS_rev	CGGTAGGGCAATGAATGTCTC	61
Sequenzierungsprimer		
pBQ200_F	AGATTTGCGGTGTCACGCAGG	61,8
pBQ200_R	TCCGGCTCGTATGTTGTGTGG	61,8
pHT304-Seq-F	CACTTTATGCTTCCGGCTCG	60
pHT304-Seq-R	TAAGTTGGGTAACGCCAGGG	60
pHT_BS_Seqint-F	GCTTTGGCCTTGCTGTTCC	62,5
pAC7_for	CTACGTGTTAAAAGGATAAACC	55
pAC7_rev	TTGTAAAACGACGGGATCC	54
pBAD33_seq_for	TAGCGGATCCTACCTGACGC	62,5
pBAD33_seq_rev	CGCGCTACTGCCGCCAGGCA	69
Psy_Seq-For	ACACGGTCACACTGCTTCCG	62,5
Psy_Seq-Rev	GCCCTTAAACGCCTGGTGCT	62,5
pKNT25-seq_for	CACACAGGAAACAGCTATGAC	57,9
pKNT25-seq_rev	GTCGGCGGCGTTTGCFTA	60,5
pKT25-seq_for2	GCGATTCGGTGACCGATTAC	59,3
pKT25-seq_rev	GGATGTGCTGCAAGGCGATT	59,3
pUT18-Seq-for	CCAAGCTTGCATGCCTGC	58,2

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
pUT18-Seq-rev	CGACGCGCCTCGGTGCCAC	69,9
pUT18C-for-seq	CTGGAAACGGTGCCGGCGTC	65,5
pUT18C-rev-seq	CGGGGCTGGCTTAACTATGC	61,4
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	54,3
T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	55,0
ML103	CTCTTGCCAGTCACGTTAC	56,7
ML104	TCTTGGAGAGAATATTGAATGGAC	57,6

3.2 Zucht und Medien

3.2.1 Zucht von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*

Für die Zucht von *E. coli* und *B. subtilis* wurden, soweit erforderlich, bei allen Arbeiten Antibiotika in der angegebenen Konzentration verwendet. Bei Zugabe mehrerer Antibiotika wurden die Konzentrationen halbiert. Gegebenenfalls erfolgte eine Induktion der Plasmide wie beschrieben.

Zucht von *Escherichia coli*

Genetische Arbeiten

Für alle genetischen Arbeiten wurden die Bakterienstämme über Nacht in 5 ml LB-Medium bei 37°C geschüttelt (Excella E24, New Brunswick Scientific).

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden die Vorkulturen in 5 ml LB-Röhrchen im Schüttelinkubator bei 37 °C über Nacht gezüchtet. Die Hauptkulturen wurden zu je 50 ml in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit 1 % Inokulum beimpft und bei 37 °C bis zur exponentiellen Wachstumsphase geschüttelt (OD_{578nm} = 0,5-0,8).

Protein-Protein Interaktionsmessungen mittels mSPINE/mHPINE (Membrane Strep/His-Protein INteraction Experiment)

Zur Untersuchung einer Protein-Protein Interaktion wurde *E. coli* C43(DE3) mit je einem Derivat des Vektors pASK-IBA3⁺ und des Vektors pBAD33 cotransformiert. Vorkulturen wurden über Nacht aerob bei 37 °C in 30 ml LB-Medium gezüchtet (Excella E24, New

Brunswick Scientific). Die Hauptkulturen wurden 2 %ig beimpft und in 2 x 400 ml LB-Medium mit 100 mM Glucose in 2 Liter Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 37°C gezüchtet. Die Proteinexpression wurde ab einer optischen Dichte von 0,5 mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin (Proteinexpression der pASK-IBA3⁺ Derivate) und 0,002 % Arabinose (Proteinexpression der pBAD33 Derivate) induziert. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{578nm} = 1,3-1,5 gezüchtet.

Protein-Protein Interaktionsmessungen mittels BACTH (Bacterial Two-Hybrid System)

Zur Untersuchung der Protein-Protein Interaktion mit dem BACTH-System wurden die entsprechenden Plasmide in *E. coli* BTH101 cotransformiert und für 40 Stunden bei 30°C auf LB-Platten mit 0,5 mM IPTG und Antibiotika gezüchtet. Vorkulturen wurden über Nacht aerob bei 30 °C in 5 ml LB-Medium mit 0,5 mM IPTG gezüchtet. Die Hauptkulturen (5 ml) wurden 4 %ig beimpft und die Proteinexpression mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellzucht erfolgte bei 30 °C bis zu einer OD_{578nm} = 0,5-0,7.

Komplementationstests von Reportergergenaktivitäten (β-Galaktosidaseaktivität)

Zuchten für die Messung aerober Reportergergenaktivitäten erfolgten in eM9-Medium mit 25 mM Glycerin und mit bzw. ohne Zugabe von 20 mM Fumarat, Succinat oder Malat. Es wurden 5 ml-Vorkulturen über Nacht gezüchtet. Die Hauptkulturen (30 ml) wurden 5 %ig angeimpft und aerob bei 37 °C für 16 Stunden bis zur stationären Phase (OD = 4,5 – 5) gezüchtet.

Für die Messung anaerober Reportergergenaktivitäten wurden die Zellen in eM9-Medium mit 50 mM Glycerin, 3 mM Gluconat, 20 mM DMSO und mit oder ohne Zugabe von 20 mM Fumarat, L-Malat, Succinat, Citrat, Butyrat, Aspartat oder L-Tartrat gezüchtet. Die Vorkulturen wurden in 5 ml des Mediums als semi-anaerobe Standkulturen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Hauptkulturen wurden 1-10 %ig angeimpft und in 10 ml des Mediums in gasdichten Sovirellröhrchen 3 x 15 min entgast. Nach jeweils 15 min wurden die Kulturen mit 1,2 atm Stickstoff begast (N₂ 5,0, Reinheit >99,999 %, Linde). Die Inkubation erfolgte anschließend bei 37 °C im Wasserbad bis zu einer optischen Dichte von 0,5-0,8. Dies entspricht der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen.

Heterologe Expression von Sensorkinasen aus thermophilen Bakterien

Die Überproduktion der Proteine erfolgte in *E. coli* C43(DE3) nach Transformation des rekombinanten pET28a-Vektors. Es wurden zunächst Vorkulturen in 50 ml LB-Medium angesetzt. Die Hauptkulturen wurden 2 %ig angeimpft und in 400 ml LB-Medium mit 100 mM Glucose in 2 Liter Erlenmeyerkolben mit Schikanen gezüchtet. Es wurden zur Überproduktion je 2 Hauptkulturen gezüchtet. Diese wurden bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Ab einer OD_{578nm} von 0,5-0,8 wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 Stunden betrug die OD_{578nm} > 2 und die Zellen wurden geerntet.

Zucht von *Bacillus subtilis*

Transformation von *B. subtilis* (Kunst und Rapoport, 1995)

Für Plasmidpräparationen aus *B. subtilis* wurden 5 ml Vorkulturen über Nacht bei 37 °C in LB-Medium gezüchtet. Für die Transformation von Plasmid-DNA oder linearer DNA wurde eine Übernachtskultur in 4 ml LB-Medium bei 30°C gezüchtet. Die Dichte der Übernachtskultur sollte am nächsten Tag eine $OD_{578nm} = 5$ nicht überschreiten. Eine Hauptkultur mit 10 ml MNGE-Medium und 1 % Casaminosäuren (CAA) wurde in 100 ml Erlenmeyerkolben ohne Schikanen auf eine OD_{578nm} von 0,1 angeimpft und bei 37°C gezüchtet. Bei Erreichen einer OD_{578nm} von 1,3 wurde 10 ml MNGE-Medium ohne CAA zugegeben und die Zellen für 1 Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Zu 400 µl der Kultur wurden in sterilen Eppendorfgläsern 300 ng bis 1 µg DNA gegeben. Es wurden mehrere Ansätze getestet, um die optimale DNA-Menge für die Aufnahme in *B. subtilis* zu gewährleisten. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl Expressionslösung zugegeben und die Zellen für 1 Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden aufkonzentriert und auf SP-Selektionsplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

Wachstumsexperimente

Für aerobe Wachstumstests wurden die Kulturen bei 37 °C in angereichertem White-Minimalmedium mit oder ohne Zugabe von 30 mM Fumarat bzw. 20 mM Succinat als C-Quellen gezüchtet. Das White-Medium wurde je nach Versuchsbedingung mit 0,1 % AHC, 0,01 % L-Tryptophan und 0,1 % Hefeextrakt oder nur mit 0,01 % Hefeextrakt angereichert. Das Volumen der Vorkulturen betrug 5 ml. Die Hauptkulturen (30 ml) wurden auf eine OD_{578nm} von 0,1 angeimpft und der aerobe Wachstumsverlauf bis zum Erreichen der stationären Phase verfolgt.

Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Zuchten für die Messung aerober *dctA-lacZ* Reporterogenaktivitäten in *B. subtilis* erfolgten in mit 0,1 % AHC und 0,01 % L-Tryptophan angereichertem White-Medium mit 20 mM Glycerin als C-Quelle und mit oder ohne Zugabe von 30 mM Fumarat. Das Volumen der Vorkulturen betrug 5 ml. Die Hauptkulturen (30 ml) wurden auf eine OD_{578nm} von 0,1 angeimpft und die Zellzucht erfolgte bis zu einer $OD_{578nm} = 1,3-1,6$.

Transportmessungen

Für Messungen des Transports von [¹⁴C]-Succinat in *B. subtilis* wurden 5 ml Übernachtskulturen in White-Medium mit 0,05 % Hefeextrakt und 20 mM Succinat als C-Quelle gezüchtet. Eine 200 ml-Hauptkultur desselben Mediums wurde in 2 Liter Erlenmeyerkolben mit Schikanen auf eine OD_{578nm} von 0,1 angeimpft und unter aeroben Bedingungen bei 37 °C bis zu einer

optischen Dichte von etwa 1,0 gezüchtet. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10000 x g, 20 min, Beckman JA-10 Rotor, 4°C) geerntet, in eiskaltem Puffer TI resuspendiert und auf eine OD_{578nm} von 8 eingestellt. Die Zellen wurden bis zur Verwendung gekühlt.

3.2.2 Medien und Puffer

Medien für *E. coli*

LB (Luria Bertani)-Medium (Sambrook und Russell, 2001)

10 g/l Casein

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

LB-Agar

LB-Medium mit 15 g/l Agar-Agar

KAXI-Agar (= Kanamycin, Ampicillin, X-Gal, IPTG)

LB-Agar mit:

50 µg/ml Kanamycin

100 µg/ml Ampicillin

500 µM IPTG

20 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal)

eM9-Minimal-Medium, pH 7 (Miller, 1992)

10 x M9-Stammlösung:

60 g/l Na₂HPO₄

30 g/l KH₂PO₄

5 g/l NaCl

10 g/l NH₄Cl

Zusätze (getrennt autoklaviert):

10 ml/l CaCl₂ x 2 H₂O, 10 mM

10 ml/l säurehydrolysiertes Casein, 10 %

5 ml/l L-Tryptophan, 1 %

1 ml/l MgSO₄ x 7 H₂O, 1 M

Kohlenstoffquellen, Elektronenakzeptoren und Effektoren (Endkonzentration):

50 mM Glycerin

3 mM Na-Gluconat, sterilfiltriert

20 mM Dimethylsulfoxid (DMSO)

20 mM Na₂-Fumarat

20 mM Na₂-L-Malat

20 mM Na₂-L-Tartrat

20mM Succinat

20 mM Na₃-Citrat (sterilfiltriert)

20 mM Asparaginsäure, mit NaOH auf pH 7 eingestellt

20 mM Buttersäure, mit NaOH auf pH 7 eingestellt

Die Stammlösungen, Zusätze, Kohlenstoffquellen, Elektronenakzeptoren und Effektoren wurden jeweils getrennt angesetzt und autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Glycerin-MOPS:

1 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)

15 % (w/v) Glycerin

Elektroporation

SOC-Medium (Sambrook und Russel, 2001):

20 g/l Casein

5 g/l Hefeextrakt

0,584 g/l NaCl

0,19 g/l KCl

2,46 g/l MgSO₄ x 7 H₂O

2,03 g/l MgCl₂ x 6 H₂O

3,96 g/l Glucose x H₂O

Herstellung hitzekompetenter Zellen

TSB-Medium:

100 g/l Polyethylenglykol (PEG 6000)

2,46 g/l MgSO₄ x 7 H₂O

2,03 g/l MgCl₂ x 6 H₂O

100 ml/l Dimethylsulfoxid (DMSO)

Antibiotikazusätze (Endkonzentration)

100 µg/ml Ampicillin
50 µg/ml Kanamycin
20 µg/ml Chloramphenicol
20 µg/ml Tetracyclin
50 µg/ml Spectinomycin

Induktoren (Stammlösungen)

1 M Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)
1 M L(+)-Arabinose
1 M Anhydrotetracyclin (AHT)

Medien für *Bacillus subtilis*

SP-Medium (Sporulationsmedium)

8 g/l Nutrient Broth
0,25 g/l MgSO₄ x 7 H₂O
1 g/l KCl
Nach dem Autoklavieren Zugabe von sterilem:
1 ml/l 0,5 M CaCl₂
1 ml/l 10 mM MnCl₂
2 ml/l Ammoniumeisencitrat (2,2 mg/ml)

SP-Agar

SP-Medium mit 15 g/l Agar

White-Minimalmedium (White, 1972)

Basalmedium:

5,566 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O
2,4 g/l KH₂PO₄
2,0 g/l (NH₄)₂SO₄

Mineralzusatz (50-fach):

2,5 g/l MgSO₄ x 7 H₂O
0,2 g/l MnCl₂ x 4 H₂O (Merck)
0,14 g/l FeSO₄ x 7 H₂O (Merck)
10 mM H₂SO₄ (Roth)

Zusätze (getrennt autoklaviert):

0,1 % AHC, 10 %

0,01 % L-Tryptophan, 1 %

0,01 - 0,1 % Hefeextrakt, 10 %

Basalmedium und Mineralzusatz wurden getrennt hergestellt und autoklaviert. Der Mineralzusatz wurde für die Zucht der Bakterien 1-fach zu dem Basalmedium zugegeben. Anschließend wurde dem Medium je nach Versuchsbedingung 0,1 % AHC, 0,01 % L-Tryptophan und 0,01-0,1 % Hefeextrakt zugegeben.

Medien für die Transformation von *B. subtilis*

MNGE-Medium:

1 x MN-Medium

100 ml/l Glukose (20%)

5 ml/l Kaliumglutamat (40%)

5 ml/l Ammoniumeisencitrat (2,2 mg/ml)

10 ml/l Tryptophan (5 mg/ml)

3 ml/l MgSO₄ (1 M)

+/- 10 ml/l Casaminosäuren (CAA) (10%)

10 x MN-Medium:

136 g/l K₂HPO₄ x 3 H₂O

60 g/l KH₂PO₄

10 g/l Natriumcitrat x 2 H₂O

Expressionslösung (1 ml):

0,5 ml/ml Hefeextrakt (5 %)

0,25 ml/ml Casaminosäuren (CAA) (10 %)

0,25 ml/ml bdH₂O

0,05 ml/ml L-Tryptophan (5 mg/ml)

Stärkeplatten

7,5 g/l Nutrient-Broth

5 g/l Stärke

15 g/l Agar

Antibiotikazusätze (Endkonzentration)

100 µg/ml Ampicillin

5 µg/ml Kanamycin

5 µg/ml Chloramphenicol

2 µg/ml Erythromycin

100 µg/ml Spectinomycin

Ampicillin, Kanamycin und Spectinomycin wurden mit dH₂O hergestellt; Chloramphenicol und Erythromycin wurden in 70 % Ethanol gelöst.

Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität in *E. coli* (Miller, 1992)

Lösungen

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

1 M Na₂CO₃

Chloroform

0,1 % SDS

β-Galaktosidase-Reaktionspuffer (pH7) (für β-Galaktosidasetests in *E. coli*)

0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (1 M KH₂PO₄, 1 M K₂HPO₄, pH 7)

10 mM KCl

1 mM MgCl₂

Der β-Galaktosidase-Reaktionspuffer wurde autoklaviert und vor Gebrauch wurden 2,7 ml/l 2-Mercaptoethanol hinzugefügt.

Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität in *B. subtilis* (Miller, 1992)

Lösungen

4 mg/ml o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid in Z-Puffer ohne 2-Mercaptoethanol

1 M Na₂CO₃

LD/Dnase-Mix: 100 mg Lysozym werden in 10 ml dH₂O gelöst, 10 mg Dnase werden hinzugegeben. Die Suspension wird in 500 µl Mengen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Z-Puffer (für β-Galaktosidasetests in *B. subtilis*)

60 mM Na₂HPO₄

40 mM NaH₂PO₄

10 mM KCl

1 mM MgSO₄

Der Z-Puffer wurde autoklaviert und vor Gebrauch wurden 50 mM 2-Mercaptoethanol hinzugefügt.

Puffer und Lösungen für Transportmessungen mit [¹⁴C]-Succinat in *B. subtilis*

Puffer TI, pH 7

38 mM NaH₂PO₄

62 mM K₂HPO₄

1 mM MgSO₄

Lösungen

0,1 M LiCl

20 µM [¹⁴C]-Succinat (Moravec Biochemicals, Brea, CA; 44 µCi/mmol)

Szintillationslösung (Roth, Rotiszint ecoplus)

Puffer und Lösungen für die Reinigung von DcuS_{Ec} und anderen Sensorkinasen (DctS_{Gk}, CitA_{Gt}, DcuS_{Pt}, PhoR_{Gk}, ResE_{Gk})

Tris/HCl-Puffer

2 M Tris, mit HCl auf pH 7,7 eingestellt

Membran-Waschpuffer

1 mM Tris/HCl, pH 7,7

3 mM Na₂-EDTA

Puffer 1

50 mM Tris/HCl pH 7,7

10 mM MgCl₂

Puffer 2 (Homogenisierungspuffer)

50 mM Tris/HCl pH 7,7

0,5 M NaCl

10 % Glycerin

10 mM Imidazol

Zugabe von 2 % Empigen zur homogenisierten Membranfraktion in Puffer 2

Puffer 3 (Äquilibrierungs- und Waschpuffer)

50 mM Tris/HCl, pH 7,7

0,5 M NaCl

10 % Glycerin

0,04 % LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid-Lösung, 30 %, Fluka)

20 mM Imidazol

Puffer 4 (Elutionspuffer)

wie Puffer 3, nur 500 mM Imidazol

Puffer und Lösungen für die Proteinreinigung bei mSPINE-Experimenten

Puffer A

20 mM Tris/HCl, pH 8

Zugabe von 2 % Empigen zur homogenisierten Membranfraktion in Puffer A

Strep-Tactin Superflow 50 % (IBA, Göttingen)

1x Puffer W (Waschpuffer)

100 mM Tris-HCl pH 8

150 mM NaCl,

1 mM EDTA

0,05 % LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid-Lösung, 30 %, Fluka)

1x Puffer E (Elutionspuffer)

100 mM Tris-HCl pH 8

150 mM NaCl

1 mM EDTA,

0,05 % LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid-Lösung, 30 %, Fluka)

2,5 mM Desthiobiotin)

10x Puffer R (Regenerationspuffer)

1 M Tris-Cl pH 8.0

1,5 M NaCl

10 mM EDTA

10 mM HABA (Hydroxy-azophenyl-benzoesäure)

Die *in vivo* Crosslinking Reaktionen wurden mit 0,6 % Formaldehyd (Roth, 37 %) durchgeführt.

Puffer und Lösungen für die Proteinreinigung bei mHPINE-Experimenten

Puffer A

20 mM Tris/HCl, pH 8

Zugabe von 2 % Empigen zur homogenisierten Membranfraktion in Puffer A

Ni²⁺-Nitrilotriacetat (Ni²⁺-NTA)

Zur Proteinisolation wurden die Puffer P3 und P4 verwendet.

Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden SDS-Gele bestehend aus einem 5 %igem Sammelgel und einem 12 %igem Trenngel nach Sambrook und Russell (2001) hergestellt.

Oberer Stammpuffer

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

Unterer Stammpuffer

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Laufpuffer (10x)

250 mM Tris

1,92 M Glycin

1 % (w/v) SDS

SDS-Auftragspuffer (2x)

100 mM Tris/HCl, pH 6,8

200 mM DTT

4 % SDS (w/v)

0,2 % Bromphenolblau (w/v)

20 % Glycerin (v/v)

Färbelösung

2 g/l Coomassie Brilliant Blue

10 % Eisessig (v/v)

5 % Methanol in H₂O (v/v)

Entfärbelösung

10 % Eisessig (v/v)

5 % Methanol in H₂O (v/v)

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

Transferpuffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

20 % Methanol (v/v)

Auffüllen mit dH₂O bis Endvolumen

1-fach PBS-Puffer (Sambrook und Russel, 2001)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

mit HCl auf pH 7,5 eingestellt

Blocking-Puffer A

1x PBS

3 % Bovines Serumalbumin (BSA)

0,1 % Tween 20

Blocking-Puffer B

50 mM Natriumphosphat

150 mM NaCl

1 % Alkali-lösliches Casein (Novagen)

Waschpuffer

0,1 % Tween 20 in 1x PBS

Antikörper-Lösung A

1 x PBS

1 % BSA

0,1 % Tween 20

+ Zugabe des Antikörpers in entsprechender Verdünnung

Antikörper-Lösung B

Blocking-Puffer B + Zugabe des Antikörpers in entsprechender Verdünnung

Verwendete Antikörper

Penta-His Antikörper, HRP Konjugat (Qiagen)

Verdünnung 1:1000-1:3000

Strep Antikörper, HRP Konjugat (IBA)

Verdünnung 1:10000-1:15000

Nachweisreaktion

Chemilumineszenz Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)

Puffer und Lösungen für die Rekonstitution von DcuS_{Ec} und DctS_{Gk}

Triton X100 (Roth)

Biobeads SM2 (Bio-Rad)

E. coli Polar Lipid Extract (Avanti Polar Lipids)

N-Octyl-β-D-Glucopyranosid (Gerbu)

20 mM Kaliumphosphatpuffer

Puffer R

50 mM Tris/HCl pH7,7

10 % Glycerin

Puffer und Lösungen für den Saccharosedichtegradienten

50 % (w/v) Saccharose-Stammlösung

50 mM Tris/HCl, pH 7,7

Puffer und Lösungen für Phosphorylierungstests

Phosphorylierungspuffer

50 mM TrisHCl, pH 7

5 mM MgCl₂)

Zu jedem Ansatz frisch dazugeben: 1 mM DTT

[³³P]-ATP (110 TBq/mmol, Hartmann Analytic)

Puffer und Lösungen für Gelretardationsexperimente

100 mM Acetylphosphat-Stammlösung

Gelöst in dH₂O; Löslichkeit von Acetylphosphat in dH₂O: 2,5 mg/ml

PH (Phosphorylierungs)-Puffer (1x)

50 mM Tris/HCl, pH7

5 mM MgCl₂

Zu jedem Ansatz frisch dazugeben: 1 mM DTT

BP-Puffer (Bindepuffer) (1x)

50 mM Tris/HCl, pH 7,5

5,5 % Glycerin

0,1 mM EDTA

50 mM KCl

10 mM MgCl₂

Zu jedem Ansatz frisch dazugeben: 1 mM DTT und 5 mg/ml salmon sperm DNA

Nativer DNA-Auftragspuffer (2x)

100 mM Tris/HCl, pH 7,5

2 mM DTT (frisch dazugeben)

20 % Glycerin

TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer

89 mM Tris-Base

89 mM Borsäure

2 mM Na₂-EDTA

3.3 Molekulargenetische Methoden

Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) sowie Restriktionsverdau von Nukleinsäuren und Ligation von Vektor und Insert wurden nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Für die Ligation wurde der Vektor direkt nach Verdau mit alkalischer Phosphatase (CIAP oder SAP, Fermentas) dephosphoryliert. Die Ligationsansätze wurden 3 Stunden bei 37 °C inkubiert und vor der Transformation mit Butanol gefällt. Das Verhältnis von Vektor zu Insert bei der Ligation betrug 1:3 oder 1:5. Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen. Die Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen geschah mit Hilfe des PCR-Purification Kits (Fermentas, Deutschland). *E. coli* Zellen wurden durch Elektroporation transformiert (Dower et al., 1988). Die Transformation von *B. subtilis* Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Kunst und Rapoport, 1995 (vgl. 3.2.1, S. 24). Plasmidisolierungen aus *E. coli* und *B. subtilis* wurden mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Deutschland) durchgeführt. Für Plasmidpräparationen aus *B. subtilis* wurden vor der Plasmidisolation 4 mg/ml Lysozym in 200 µl des Resuspensionspuffers aus dem Isolationskit zugegeben und der Ansatz bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Isolation von genomischer DNA aus *B. subtilis* und *G. kaustophilus* erfolgte mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA-Gelelektrophorese wurde in einem 1 %igen Agarosegel bei 90 V für 40 min durchgeführt.

Gerichtete Mutagenesen wurden mit der *Pfu*-Polymerase (Fermentas) in Kombination mit *DpnI*-Endonuklease (Fermentas) und *E. coli* XL1-Blue hitzekompetenten Zellen (Stratagene) durchgeführt. Zur Herstellung der hitzekompetenten Zellen wurde *E. coli* XL1-Blue unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bis zu einer OD_{578nm} von 0,5 gezüchtet. Die Zellen wurden anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert, geerntet und mehrfach mit eiskaltem

TSB-Medium gewaschen. Pro ml Zucht wurden die Zellen in 10 µl TSB resuspendiert, auf 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Transformation erfolgte nach der Anleitung des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits.

Alle hergestellten Plasmide wurden durch Sequenzierung der Konstrukte überprüft (Agowa LGC, Berlin).

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al., 1986). Die DNA-Fragmente wurden mittels *Pfu*-Polymerase (Fermentas) vervielfältigt. Die Reaktionen wurden entweder mit dem i-cycler (Bio-Rad) oder mit dem MyCycler (Bio-Rad) durchgeführt. Die Reaktionsansätze betragen 50 µl. Ein Ansatz enthielt 100-300 ng genomische DNA oder 20-100 ng Plasmid-DNA, je 0,5 µM Primer, 1-3 % DMSO, 0,25 mM dNTP-Mix, 2,5 U *Pfu* DNA-Polymerase (Fermentas), 1x PCR-Puffer (enthält 2 mM MgCl₂) und bdH₂O. Die verwendeten Oligonukleotide stammen von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) oder Sigma Aldrich. In Tab. M3 ist das PCR-Programm dargestellt.

Tab. M3: **PCR-Programm zur Amplifikation von Plasmid- bzw. genomischer DNA.**

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
(1) Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
(2) Denaturierung*	95 °C	30 sec
(3) Annealing*	T _m – 5 °C	30 sec
(4) Elongation*	72 °C	2 min/kb
(5) Finale Elongation	72 °C	10 min

* Die Zyklen 2-4 wurden 30 mal wiederholt. T_m = Schmelzpunkt der Primer

Die Annealing-Temperaturen wurden anhand der Schmelztemperaturen (T_m) der Primer gewählt und lagen im Bereich von - 5 °C der T_m der Primer. Die optimale Annealingtemperatur wurde mittels Gradienten-PCR ermittelt. Die Schmelztemperaturen der Primer wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$T_M = 69,3 + 0,41 \times \% \text{ GC} - 650/n.$$

n = Anzahl der Nukleotide

% GC = GC-Gehalt in %

Die Elongationszeit wurde nach der Länge des zu amplifizierenden Gens gewählt. Dabei geht man bei Amplifikation genomischer DNA bzw. Plasmid-DNA von einer Elongationszeit der *Pfu*-Polymerase von 2 min für 1000 Nukleotide aus.

3.3.2 Konstruktion von Plasmiden

Die Konstruktion von *E. coli* Plasmiden sowie *E. coli/B. subtilis* Shuttleplasmiden wird auf den folgenden Seiten beschrieben. Alle Konstrukte wurden durch Kontrollverdau und Sequenzierung überprüft.

Plasmide für mSPINE/mHPINE (Membrane Strep/His-Protein Interaction Experiment)

Für Protein-Protein Untersuchungen mittels mSPINE und mHPINE wurden die C-Termini von DctS, DctB und DctA mit einem Strep- und/oder His₆-Anhang versehen. Hierfür wurden die entsprechenden Gene für die Fusion mit einem Strep-Anhang in den Vektor pASK-IBA3⁺ kloniert und für die Fusion mit einem His₆-Anhang aus dem Vektor pET28a in den Vektor pBAD33 kloniert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Gene aus dem Chromosom von *B. subtilis* 168 amplifiziert. Die verschiedenen Proteinkombinationen für die Interaktionsstudien zwischen DctS, DctB und DctA in mSPINE- und mHPINE-Untersuchungen sind in Abb. M1 zusammengefasst.

Die C-Termini von DctS und DctA wurden mit einem Strep-Anhang versehen. Die Herstellung des Vektors pMW1788 (*dctS*-Strep) erfolgte mit den Primern *dctS*-pASK-For und *dctS*-pASK3-Rev über die Schnittstellen *KpnI* und *Sall*. Ein N-terminaler Strep-Anhang wurde an DctS fusioniert durch Herstellung des Plasmids pMW1789 mit den Primern *dctS*-pASK-For und *dctS*-pASK13-Rev über die Schnittstellen *KpnI* und *Sall*. Dieses Plasmid wurde jedoch nicht für die Interaktionsmessungen verwendet. Zur Erstellung des DctA-Strep Expressionsplasmids pMW1974 wurde *dctA* mit den Primern *dctA*-1797-F und *dctA*-1797-R aus dem Vektor pMW1797 amplifiziert und durch ungerichtete Mutagenese über eine *EcoRI*-Schnittstelle in pASK-IBA3⁺ kloniert. Die Orientierung von *dctA* in pMW1974 wurde durch Kontrollverdau überprüft. Für die Herstellung der DctB-His₆ und DctA-His₆ Expressionsplasmide wurde *dctB* bzw. *dctA* zunächst in den Vektor pET28a mit einem C-terminalen His₆-Anhang kloniert. Die Konstruktion des Vektors pMW1791 (*dctB*-His₆) erfolgte mit den Primern C-*dctBBs*_pET-For und C-*dctBBs*_pET-Rev über die Schnittstellen *NcoI* und *HindIII*. Der Vektor pMW1793 (*dctA*-His₆) wurde mit den Primern C-*dctABs*_pET-For und C-*dctABs*_pET-Rev über die Schnittstellen *NcoI* und *EcoRI* erstellt. Zur Konstruktion von pMW1795 bzw. pMW1797 wurde *dctB*-His₆ bzw. *dctA*-His₆ mit der Ribosomenbindestelle aus pET28A mit den Primern pBAD_Umk-For und pBAD_Umk-Rev über eine *KpnI*-Schnittstelle in den Vektor pBAD33 kloniert. Es wurde auch ein N-terminaler His₆-Anhang an DctB bzw. DctA fusioniert durch Klonierung in den Vektor pET28. Die resultierenden Plasmide pMW1790 (His₆-*dctB*) bzw. pMW1792 (His₆-*dctA*) wurden mit den Primern N-*dctBBs*_pET-For + N-*dctBBs*_pET-Rev bzw. N-*dctABs*_pET-For + N-*dctABs*_pET-Rev über die Schnittstellen *NdeI* und *Sall* bzw. *NdeI* und *EcoRI* erstellt. His₆-*dctB* bzw. His₆-*dctA* wurden jedoch nicht in den

Vektor pBAD33 umkloniert, lassen sich aber auch mit den Primern pBAD_Umk-For und pBAD_Umk-Rev umklonieren.

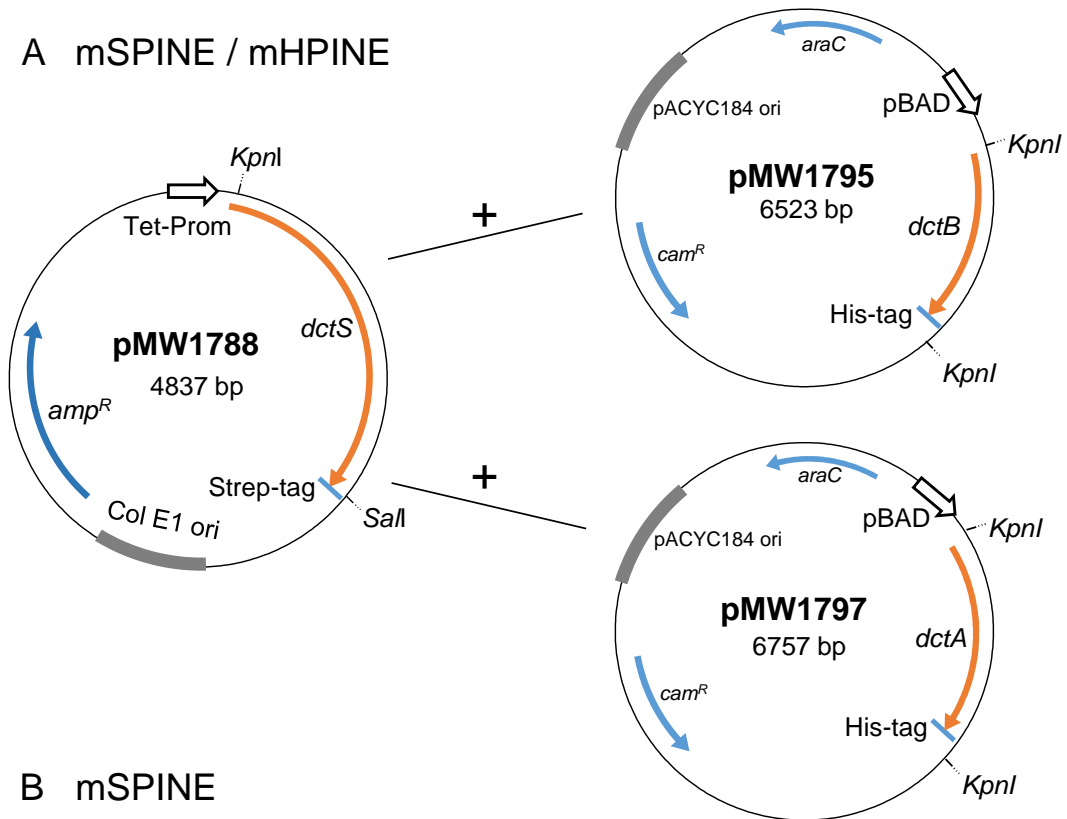
Für die Untersuchung der gleichzeitigen Interaktion von DctS, DctB und DctA wurde das Plasmid pMW1975 erstellt, in welchem sich DctA-His₆ und DctB-His₆ unabhängig voneinander exprimieren lassen. Hierfür wurde *dctA*-His₆ mit dem pBAD-Promotorbereich sowie der Ribosomenbindestelle aus dem Vektor pMW1797 mit den Primern Psy-For und Psy-Rev2 über eine *PsyI*-Schnittstelle in den Vektor pMW1795 kloniert. Die Expression von DctA-His₆ und DctB-His₆ erfolgt jeweils durch einen pBAD-Promotor. Zwischen dem für *dctB*-His₆ und dem für *dctA*-His₆ kodierenden Bereich ist eine Transkriptions-Terminationssequenz lokalisiert, sodass keine gemeinsame Transkription der beiden Gene erfolgt. Nach dem kodierenden Bereich für *dctA*-His₆ befindet sich ebenfalls eine Transkriptions-Terminationssequenz.

Das His₆-DctP_{Aa} Expressionsplasmid pMW1800, welches für mSPINE Kontrollexperimente verwendet wurde, wurde durch Klonierung von *dctP* aus *Aromatoleum aromaticum* in den Vektor pET28a mit den Primern DctP2_for und DctP2_rev über die Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI* erstellt.

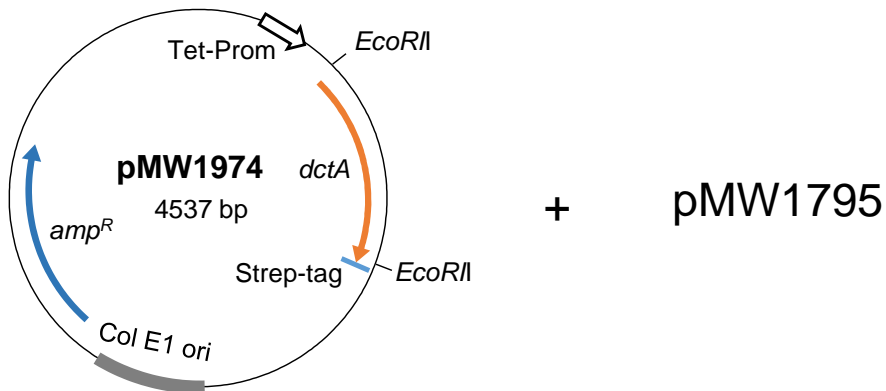
Plasmide für das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System

Für Protein-Protein Interaktionsmessungen mit dem Bacterial Two-Hybrid System wurden N- oder C-terminale Fusionsproteine von DctS, DctB und DctA mit einem T25- oder T18-Fragment der Adenylatzyklase erstellt. Zur Herstellung einer N-terminalen Fusion des Zielproteins an T25 erfolgte die Klonierung in den Vektor pKT25. Eine C-terminale Fusion des Zielproteins an T25 erfolgte durch Klonierung in den Vektor pKNT25. Die beiden T25-Plasmide besitzen einen *p15*-Replikationsursprung und eine Kanamycin-Resistenzkassette (Karimova et al., 1998). Zur Gewährleistung der Selektierbarkeit und genetischen Stabilität bei Cotransformation eines T25- mit einem T18-Plasmid, besitzen die T18-Plasmide eine Ampicillin-Resistenzkassette und einen *coIE1*-Replikationsursprung. Die Klonierung in den Vektor pUT18C führt zu einer N-terminalen Fusion des Zielproteins an T18. Für die C-terminale Fusion des Zielproteins an T18 wurde der Vektor pUT18 verwendet. Zur Herstellung der *dctS*, *dctB*- bzw. *dctA*-Fusionsproteine wurden die entsprechenden Gene aus dem Genom von *B. subtilis* 168 amplifiziert und über die Schnittstellen *BamHI* und *KpnI* in die jeweiligen Vektoren kloniert. Die verwendeten Primer für die Herstellung der einzelnen Plasmide sind in Tab. M4 zusammengefasst.

A mSPINE / mHPINE



B mSPINE



C mSPINE DctS/DctA/DctB

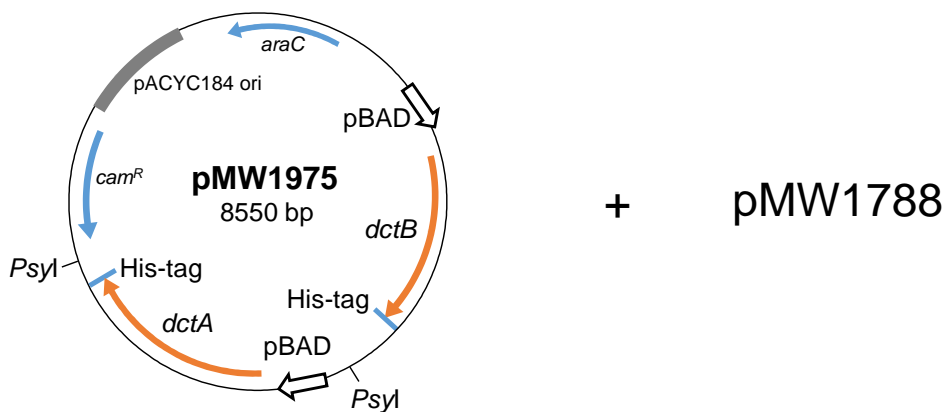


Abb. M1: **Verwendete Plasmide für Protein-Protein Interaktionsstudien mittels mSPINE/mHPINE (Membrane Strep/His-Protein Interaction Experiment)**. Die Plasmide pMW1788 und pMW1974 sind Derivate des Vektors pASK-IBA3⁺; pMW1795, pMW1797 und pMW1975 sind Derivate des Vektors pBAD33. (A) Die Interaktion zwischen DctS und DctB bzw. zwischen DctS und DctA wurde in mSPINE- sowie in mHPINE-Experimenten untersucht. Hierfür wurden pMW1788 (*dctS*-Strep) und pMW1795 (*dctB*-His₆) bzw. pMW1788 und pMW1797 (*dctA*-His₆) in *E. coli* C43(DE3) cotransformiert. (B) Die Interaktion zwischen DctA und DctB wurde in mSPINE-Experimenten untersucht. Dazu wurden pMW1974 (*dctA*-Strep) und pMW1795 (*dctB*-His₆) in *E. coli* C43(DE3) cotransformiert. (C) Für die Untersuchung der gleichzeitigen Interaktion zwischen DctS und DctA sowie DctS und DctB erfolgte die Cotransformation von pMW1975 (*dctA*-His₆ + *dctB*-His₆) mit pMW1788 (*dctS*-Strep).

Tab. M4: **Verwendete Primer für die Herstellung der Plasmide für das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System**. Die Forward-Primer enthalten für die Klonierung jeweils eine *Bam*HI-Schnittstelle, die Reverse Primer eine *Kpn*I-Schnittstelle.

Plasmid	Protein fusion	Verwendete Primer	Plasmid	Protein fusion	Verwendete Primer
pMW1693	T25-DctS	dctS-BS-2518-F+ dctS-BS-2518C-R	pMW1701	T25-DctA	dctA-BS-2518-F+ dctA-BS-2518C-R
pMW1694	DctS-T25	dctS-BS-2518-F+ dctS-BS-2518N-R	pMW1702	DctA-T25	dctA-BS-2518-F+ dctA-BS-2518N-R
pMW1695	DctS-T18	dctS-BS-2518-F+ dctS-BS-2518N-R	pMW1703	DctA-T18	dctA-BS-2518-F+ dctA-BS-2518N-R
pMW1696	T18-DctS	dctS-BS-2518-F+ dctS-BS-2518C-R	pMW1704	T18-DctA	dctA-BS-2518-F+ dctA-BS-2518C-R
pMW1697	T25-DctR	dctR-BS-2518-F+ dctR-BS-2518C-R	pMW1705	T25-DctB	dctB-BS-2518-F+ dctB-BS-2518C-R
pMW1698	DctR-T25	dctR-BS-2518-F+ dctR-BS-2518N-R	pMW1706	DctB-T25	dctB-BS-2518-F+ dctB-BS-2518N-R
pMW1699	DctR-T18	dctR-BS-2518-F+ dctR-BS-2518N-R	pMW1707	DctB-T18	dctB-BS-2518-F+ dctB-BS-2518N-R
pMW1700	T18-DctR	dctR-BS-2518-F+ dctR-BS-2518C-R	pMW1708	T18-DctB	dctB-BS-2518-F+ dctB-BS-2518C-R

Plasmide für die Expression und Funktionskomplementation in *E. coli*

Für die heterologe Expression von DcuS-ähnlichen Sensor-kinasen in *E. coli* wurden die entsprechenden Gene aus der genomischen DNA der thermophilen Bakterien amplifiziert und in den Vektor pET28a kloniert. Alle Proteine enthalten einen N-terminalen His₆-Anhang und werden über den induzierbaren T7-Promotor des pET28a Vektors exprimiert. Beispielhaft ist die Vektorkarte von pMW817 dargestellt (Abb. M2; *dctS_{Gk}* in pET28a). Der Vektor pMW817 wurde mit den Primern q5L216-*Nde*I-for und q5L216-*Nde*I-rev über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Eco*RI konstruiert. Die Punktmutanten von DctS_{Gk} zur Untersuchung der periplasmatischen PASp-Domäne wurden durch Mutagenese des Plasmids pMW817 mit den in Tab. M2 aufgelisteten Primern erstellt. Die Herstellung des His₆-CitA_{Gt} Expressionsplasmids pMW960 erfolgte mit den Primern *dcuS_{Gt}*-for und *dcuS_{Gt}*-rev über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I. Das Plasmid pMW961 zur Expression von His₆-DcuS_{Pt} wurde mit den Primern *dcuS_{Pt}*-for und *dcuS_{Pt}*-rev über die Schnittstellen *Nde*I und *Eco*RI

erstellt. Das Plasmid pMW972 (His₆-PhoR_{Gk}) bzw. pMW973 (His₆-ResE_{Gk}) wurde mit den Primern q5KWC0for und q5KWC0rev bzw. q5KXM3for und q5KXM3rev über die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* bzw. *EcoRI* und *NdeI* konstruiert.

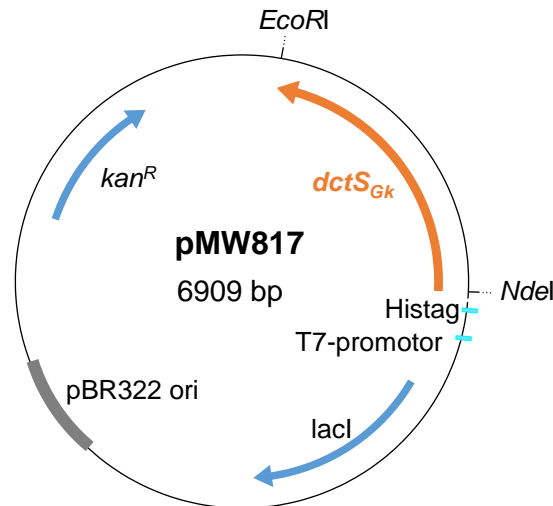


Abb. M2: **Das His₆-DctS_{Gk} Expressionsplasmid pMW817.** Das Plasmid ist ein Derivat des Vektors pET28a. Die für die Sensorkinasen CitA_{Gt}, DcuS_{Pt}, PhoR_{Gk} und ResE_{Gk} kodierenden Gene wurden entsprechend in den pET28a Vektor kloniert. Diese enthalten alle einen N-terminalen His₆-Anhang und die Expression ist unter der Kontrolle des T7-Promotors.

Konstruktion von *E. coli* / *B. subtilis* Shuttleplasmiden

Die meisten kleineren Plasmide (Größe < 10 kb) zur Replikation in grampositiven Bakterien sind strukturell instabil, da sie nach einem rolling circle Mechanismus repliziert werden (Jannière et al., 1990). Zur Konstruktion von stabil replizierenden Plasmiden wurde der *E. coli*/*B. subtilis* Shuttlevektor pHT1035 erstellt (Arantes und Lereclus, 1991). Dieser hat eine Größe von 6,3 kb und besitzt für die Replikation in *B. subtilis* ein 2,6 kb großes Fragment aus dem Plasmid pHT3010 (Größe = 15 kb) von *B. thuringiensis*. Das 2,6 kb große Fragment beinhaltet den Replikationsorigin ori 1030 und weitere bisher nicht genau bestimmte Faktoren zur Stabilisierung der Replikation des Plasmids in grampositiven Bakterien. Die Replikation verläuft nicht nach dem rolling circle Mechanismus, die Kopienzahl des Plasmids beträgt 4-5 Kopien pro Zelle.

His₆-DctS_{Gk} sollte für Komplementationstests in *Bacillus subtilis* von einem Plasmid exprimiert werden. Hierfür wurde *his₆-dctS_{Gk}* in den *E. coli*/*B. subtilis* Shuttlevektor pBQ200 kloniert (Abb. M3). Dieser ist ein Derivat des Vektors pHT1035 und besitzt für die Replikation in *B. subtilis* ebenfalls den Replikationsorigin ori 1030, jedoch mit einer höheren Kopienzahl. Durch Behandlung von pHT1035 mit Hydroxylamin wurden Plasmide generiert, die eine höhere oder niedrigere Kopienzahl besitzen (Arantes und Lereclus, 1991). Der Vektor pBQ200 wird in *B. subtilis* mit einer Kopienzahl von 15-20 Kopien/Zelle repliziert. Für die Selektion des Vektors in *B. subtilis* verfügt pBQ200 über eine Erythromycin-Resistenzkassette. Zur Expression der

einklonierten Gene in *B. subtilis* besitzt der Vektor pBQ200 den konstitutiven Promotor $degQ^h$ (oder auch $degQ36$ genannt). Dieser Promotor besitzt eine Punktmutation des Promotors $degQ$, welcher für die Expression des Regulators DegQ in *B. subtilis* verantwortlich ist (Klier et al., 1992). Die Punktmutation des Promotors führt zu einer erhöhten Proteinexpression. Der Vektor pBQ200 besitzt keine Ribosomenbindestelle für die Proteinexpression, sodass diese durch die Klonierung hinzugefügt werden muss. Für die Expression von His₆-DctS_{Gk} in pBQ200 wurde bei der Klonierung über den Forward-Primer die Ribosomenbindestelle des Gens *gapA* aus *B. subtilis* eingebracht (Abb. M3). Die Klonierung von his_6-dctS_{Gk} in pBQ200 erfolgte in *E. coli* mit den Primern $dctS_Q200_for$ und $dctS_Q200_rev$ aus dem Vektor pMW817 über die Restriktionsschnittstellen *Pst*I und *Hind*III. Für die Replikation in *E. coli* besitzt der Vektor den pBR322 Replikationsursprung aus dem Vektor pUC19 (Arantes und Lereclus, 1991). Außerdem ist eine Ampicillin-Resistenzkassette für die Selektion des Vektors in *E. coli* vorhanden.

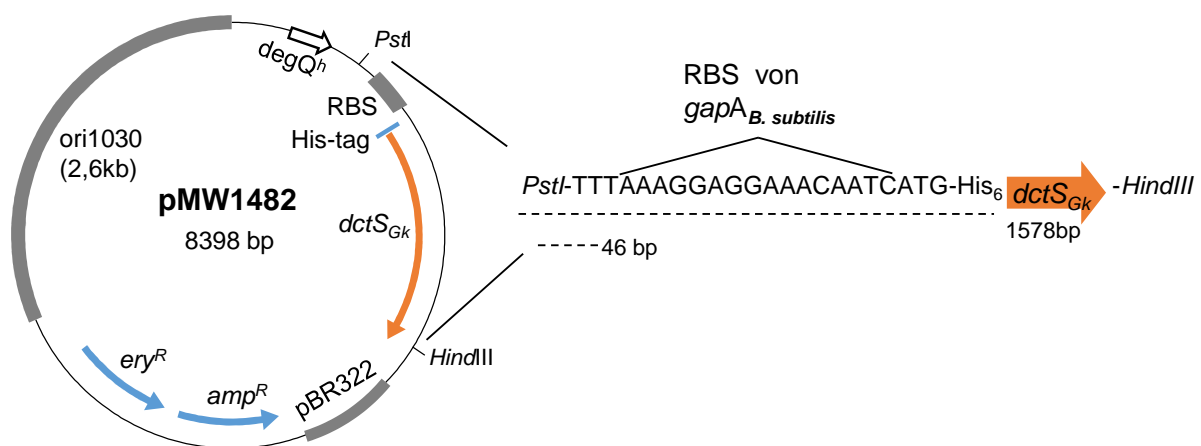


Abb. M3: **Klonierung von his_6-dctS_{Gk} in den Shuttlevektor pBQ200.** Das Plasmid pMW1482 wurde durch Klonierung von his_6-dctS_{Gk} aus dem Vektor pMW817 mit den Primern $dctS_Q200_for$ und $dctS_Q200_rev$ über die Schnittstellen *Pst*I und *Hind*III kloniert. Über den Forward-Primer wurde zur Expression von His₆-DctS_{Gk} die Ribosomenbindestelle des Gens *gapA* aus *B. subtilis* eingebracht (rechtes Bild).

Für Komplementationsversuche in *B. subtilis* sollte außerdem DctS_{Bs} plasmidkodiert exprimiert werden. Hierfür wurde $dctS_{Bs}$ mit dem Intergenbereich stromaufwärts von $dctS_{Bs}$ aus genomischer DNA mit den Primern $dctS_BS_F$ und $dctS_BS_R$ amplifiziert und über die Schnittstellen *Pst*I und *Sal*I in den Vektor pHT304 kloniert (Abb. M4; pMW1558). Für Komplementationsversuche mit plasmidkodiertem DctS_{Bs} und DctR_{Bs} wurde $dctSR_{Bs}$ mit dem stromaufwärts von $dctS_{Bs}$ liegenden Intergenbereich ebenfalls in pHT304 kloniert. Das resultierende Plasmid pMW1609 wurde mit den Primern $dctSR_BS-For$ und $dctSR_BS-Rev$ über die Schnittstellen *Pst*I und *Sal*I erstellt. Der Vektor pHT304 ist wie pBQ200 ein *E. coli/B. subtilis* Shuttleplasmid und stammt ebenso von dem Vektor pHT1035 ab. Im Gegensatz zu pBQ200 besitzt der Vektor pHT304 jedoch keinen Promotorbereich zur Expression des

einklonierten Gens. Daher wurde *dctS_{Bs}* bzw. *dctSR_{Bs}* mit dem Intergenbereich stromaufwärts des Gens kloniert, sodass die Expression durch den eigenen Promotor sowie die eigene Ribosomenbindestelle erfolgt. Die Kopienzahl des Vektors pHT304 ist mit 4-5 Kopien/Zelle geringer als jene von pBQ200.

Zur plasmidkodierten Expression von DctA-His₆ aus *B. subtilis* für Transportmessungen wurde *dctA_{Bs}* mit den Primern *dctA_F* und *dctA_R* aus genomischer DNA amplifiziert und über die Schnittstellen *Bam*HI und *Pae*I in den Vektor pBQ200 kloniert. Das resultierende Plasmid pMW1927 erlaubt die Expression von DctA-His₆ durch den *degQ^h*-Promotor sowie durch die Ribosomenbindestelle des *gapA*-Gens aus *B. subtilis*, welche wie bei der Klonierung von *dctS_{Gk}* über den Forward-Primer eingefügt wurde (vgl. Abb. M3). Außerdem wurde über den Reverse-Primer ein C-terminaler His₆-Anhang eingefügt.

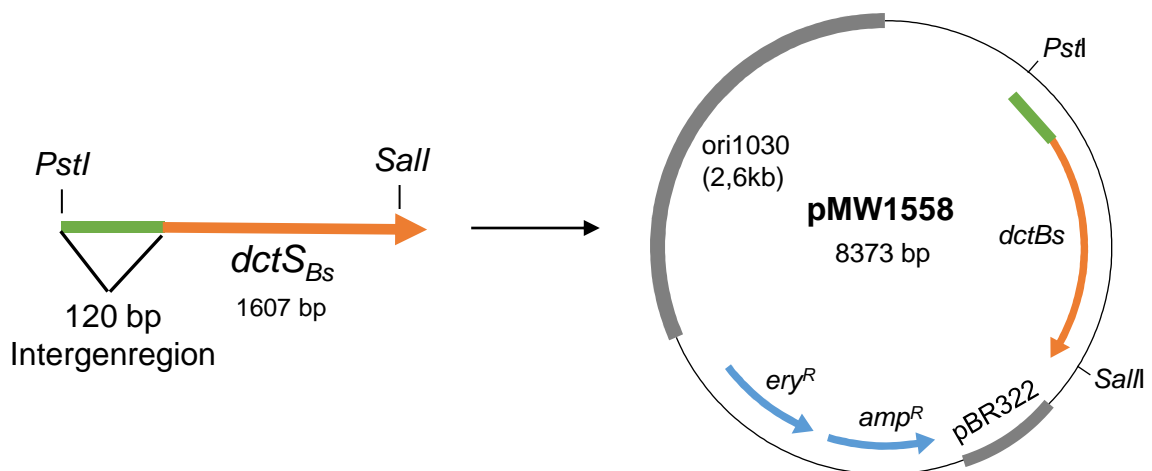


Abb. M4: **Klonierung von *dctS* aus *B. subtilis* (*dctS_{Bs}*) in den low-copy Shuttlevektor pHT304.** Die Klonierung von *dctS_{Bs}* erfolgte mit dem Intergenbereich vor *dctS_{Bs}* (120 bp, in grün dargestellt), welcher den Promotorbereich sowie eine Ribosomenbindestelle enthalten sollte. Der Vektor pHT304 ist wie der Vektor pBQ200 aufgebaut, besitzt jedoch keinen Promotor zur Expression des einklonierten Gens. Außerdem ist die Kopienzahl von pHT304 mit 4-5 Kopien/Zelle geringer als die des Vektors pBQ200.

3.3.3 Stammkonstruktion in *B. subtilis*: Herstellung von Insertionsmutanten und chromosomalen Reporterfusionen

Herstellung von *dctS*- und *dctB*-Insertionsmutanten in *B. subtilis*

Die Inaktivierung von *dctS* bzw. *dctB* in *B. subtilis* erfolgte durch die Insertion einer Chloramphenicol- bzw. Spectinomycin-Resistenzkassette mittels LFH (Long-Flanking-Homology)-PCR (Wach, 1996). Bei dieser Methode werden zunächst etwa 1 kb große Bereiche stromaufwärts sowie stromabwärts des auszuschaltenden Gens amplifiziert. Bei der Amplifizierung wird diesen Fragmenten durch einen 5'-Überhang der Primer ein zur Resistenzkassette komplementäres Ende angehängt (Abb. M5). Nach Amplifikation der Resistenzkassette aus einem Vektor wird eine Joining-PCR durchgeführt. Die Joining-PCR führt zur Bildung eines etwa 3 kb großen Fragmentes bestehend aus den Stromaufwärts- und Stromabwärtsfragmenten des auszuschaltenden Gens sowie der Resistenzkassette. Nach Transformation dieses Fragmentes in *B. subtilis* kommt es über die Stromaufwärts- und Stromabwärtsbereiche des auszuschaltenden Gens zur homologen Rekombination der Resistenzkassette (Abb. M5). Dadurch wird das Gen durch die Resistenzkassette ersetzt.

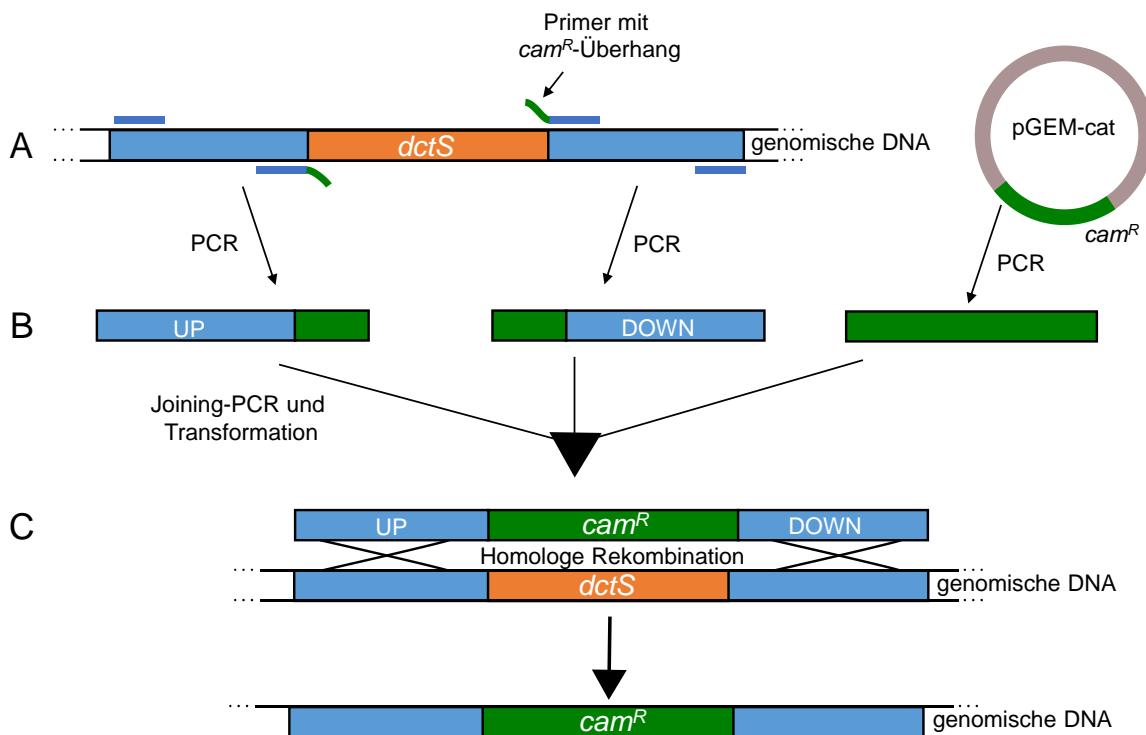


Abb. M5: **Konstruktion von Insertionsmutanten in *B. subtilis* am Beispiel der Inaktivierung von *dctS*.** (A) Stromaufwärts (UP) und stromabwärts (DOWN) von *dctS* werden etwa 1 kb große Fragmente amplifiziert, die am 3'-Ende bzw. am 5'-Ende komplementäre Sequenzen zur Chloramphenicol-Resistenzkassette besitzen. Das Chloramphenicol-Resistenzgen (*cam^R*) wird aus dem Vektor pGEM-cat amplifiziert. (B) Durch die Joining-PCR wird ein etwa 3 kb großes Fragment bestehend aus dem Up- und Down-Bereich sowie des *cam^R*-Gens amplifiziert. (C) Über die Up- und Down-Bereiche kommt es nach Transformation des Fragmentes in *B. subtilis* zur homologen Rekombination der *cam^R*-Resistenzkassette in das Chromosom.

Zur Inaktivierung von *dctS* in *B. subtilis* wurde das Gen durch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette ersetzt. Das Stromaufwärtsfragment von *dctS* wurde mit den Primern *dctS1* und *dctS2* aus genomischer DNA amplifiziert und besitzt eine Größe von 1043 bp. Das Stromabwärtsfragment wurde mit den Primern *dctS3* und *dctS4* aus genomischer DNA amplifiziert und hat eine Größe von 1133 bp. Die Amplifizierung des Chloramphenicol-Resistenzgens erfolgte aus dem Vektor pGEM-cat mit den Primern *cat-fwd* und *cat-rev*. Die Joining-PCR erfolgte mit den Primern *dctS1* und *dctS4*, sodass ein Fragment bestehend aus dem Stromaufwärts- und Stromabwärtsfragment von *dctS* und dem Resistenzgen gebildet werden konnte. Die Joining-PCR wurde wie in Tab. M5 beschrieben durchgeführt. Es wurden zunächst 10 Zyklen mit den drei Fragmenten, jedoch ohne Primer durchgeführt. So konnten die einzelnen Fragmente aufgeschmolzen werden, wodurch eine bessere Bindung aneinander und zu den anschließend hinzugefügten Primern ermöglicht wurde. 5-20 µl des PCR-Ansatzes wurden in *B. subtilis* transformiert. In dem resultierenden Stamm IMW595 wurde die Integrität der Bereiche stromaufwärts und stromabwärts von *dctS* durch Sequenzierung mit den Primern *seq1* bzw. *seq2* überprüft.

Tab. M5: **PCR-Programm der Joining-PCR.** Die PCR wurde mit der Phusion-Polymerase (Fermentas) in einem 50 µl-Ansatz durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
(1) Initiale Denaturierung	98 °C	1 min
(2) Denaturierung	98 °C	10 sec
Annealing	54 °C	30 sec
Elongation	72 °C	75 sec
Zugabe der Primer		
(3) Denaturierung	98 °C	10 sec
Annealing	54 °C	30 sec
Elongation	72 °C	75 sec + 5 sec/Zyklus
(4) Finale Elongation	72 °C	10 min

Zur Inaktivierung von *dctB* in *B. subtilis* wurde das Gen durch eine Spectinomycin-Resistenzkassette ersetzt. Das Stromaufwärts- bzw. Stromabwärtsfragment wurde mit dem Primerpaar *dctBBS_up_F* + *dctBBS_up_R* bzw. *dctBBS_down_F* + *dctBBS_down_R* amplifiziert. Die Amplifikation der Spectinomycin-Resistenzkassette erfolgte aus dem Plasmid pDG1726 mit den Primern *spec_fwd* und *spec_rev*. Die Joining-PCR wurde wie in Tab. M5 beschrieben mit den Primern *dctBBS_up_F* und *dctBBS_down_R* durchgeführt. Nach homologer Rekombination in das Chromosom von *B. subtilis* wurde in dem resultierenden Stamm IMW610 die Integrität der zur Spectinomycin-Resistenzkassette flankierenden Bereiche durch Sequenzierung mit dem Primer *sequ_upstr* bzw. *sequ_downstr* überprüft.

Konstruktion von *dctA-lacZ* und *dctB-lacZ* Reporterfusionen in *B. subtilis*

Zur Untersuchung der Expression von *dctA* in Abhängigkeit von C₄-Dicarbonsäuren und dem Zweikomponentensystem DctSR wurde eine chromosomale *dctA-lacZ* Reporterfusion in *B. subtilis* 168 erstellt. Das *dctA*-Gen liegt stromabwärts von *dctSR* und besitzt einen von *dctSR* unabhängigen Promotor (Asai et al., 2000). Der Transkriptionsstartpunkt von *dctA* wurde durch Primer Extension bestimmt (Asai et al., 2000; Abb. M6). Daraus wurden die -10- sowie die -35-Region des *dctA*-Promotors abgeleitet. Der Bereich stromaufwärts der -35-Region wurde sukzessiv verkürzt und die Aktivität einer *dctA-bgaB* Reporterfusion der verkürzten Bereiche gemessen (Asai et al., 2000). Bei Deletion eines „direct repeats“ stromaufwärts der -35-Region wurde keine Reportergenaktivität mehr festgestellt, dieser Bereich ist daher essentiell für die *dctA*-Expression (Abb. M6).

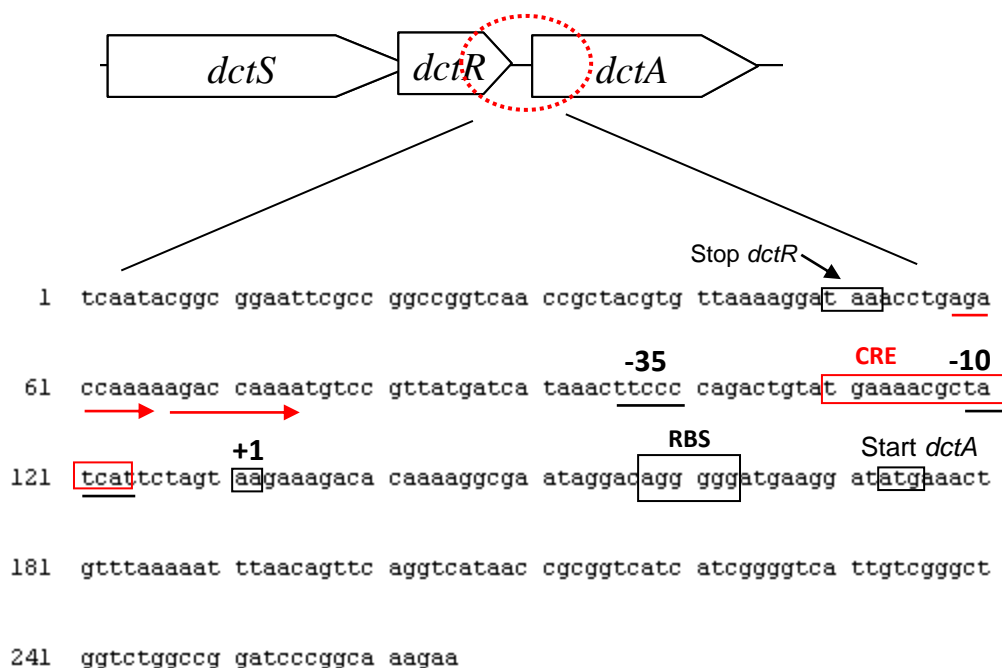


Abb. M6: **Der Promotorbereich von *dctA* in *B. subtilis*.** Der Intergenbereich zwischen *dctR* und *dctA* umfasst 186 bp. Durch Primer Extension wurde der Transkriptionsstartpunkt von *dctA* bestimmt (+1; Asai et al., 2000) und die -10- sowie -35-Region des Promotors abgeleitet (unterstrichen). Der für die Expression von *dctA* essentielle Bereich stromaufwärts der -35-Region ist durch rote Pfeile dargestellt. Die -10-Region von *dctA* besitzt eine Konsensussequenz der CRE- (Catabolite Responsive Element) Bindestelle (rotes Kästchen), an welche vermutlich der Transkriptionsregulator CcpA (Catabolite control protein A) bindet. Die vorhergesagte Ribosomenbindestelle (RBS) für die Initiation der Translation ist durch ein schwarzes Kästchen dargestellt.

Zur Herstellung einer translationalen *dctA-lacZ* Reporterfusion in *B. subtilis* wurde zunächst der Promotorbereich von *dctA* vor ein promotorloses *lacZ*-Gen in den Vektor pAC7 kloniert (Abb. M7). Der Vektor pAC7 besitzt einen pBR322-Replikationsursprung zur Replikation und ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*, sodass die Klonierung in *E. coli* erfolgt. Die Reportergenaktivität der Fusion im Vektor pAC7 kann in *E. coli* durch

Blau/Weiß-Screening überprüft werden. Bei Aktivität des Reportergens erfolgt auf X-Gal haltigen LB-Platten ein Farbumschlag des Indikatorfarbstoffs von weiß (keine Aktivität) nach blau (Aktivität). Das Plasmid pMW1475, welches die *dctA-lacZ* Reporterengenfusion enthält, wurde mit den Primern *dctA-lacZ_for2* und *dctA-lacZ_rev* über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* erstellt (Abb. M7). Der Vektor pMW1475 enthält komplementäre Sequenzen zu dem *amyE*-Gen in *B. subtilis* (Abb. M7, Abb. M8). Nach Linearisierung von pMW1475 mit *PstI* und Transformation des linearen Fragmentes in *B. subtilis* kommt es zur homologen Rekombination in den *amyE*-Genlokus der chromosomalen DNA (Abb. M8). Der resultierende Stamm IMW597 besitzt eine chromosomale *dctA-lacZ* Reporterengenfusion sowie eine Kanamycin-Resistenzkassette zur Selektion.

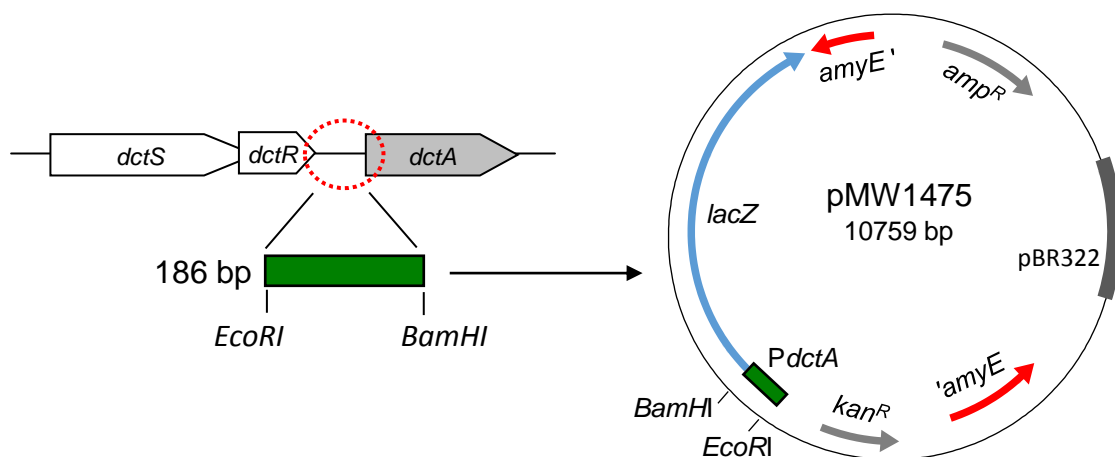


Abb. M7: **Konstruktion des Plasmids pMW1475 mit einer translationalen *dctA-lacZ* Reporterengenfusion.** Das Plasmid ist ein Derivat des Vektors pAC7, welcher ein promotorloses *lacZ*-Gen besitzt. Der Promotorbereich von *dctA* wurde über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* vor das *lacZ*-Gen kloniert.

Das *amyE*-Gen kodiert für eine α -Amylase, welche die α -(1,4)-glykosidische Bindung der Amyloseeinheiten von Stärke spaltet. Die erfolgreiche Integration des Reportergens in den *amyE*-Lokus kann auch durch fehlende Stärkehydrolyse sichtbar gemacht werden. Hierfür wird der Stamm auf Stärkeplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Anschließend wird mit Lugol'scher Lösung (10 % Kaliumiodid und 5 % Jod in dH₂O) ein Stärkenachweis auf den Platten durchgeführt. Die 5 %ige Lugol'sche Lösung muss für den Stärkenachweis 1:5 verdünnt werden.

Das linearisierte Plasmid pMW1475 wurde ebenfalls in die *B. subtilis* *dctS*-Insertionsmutante IMW595 transformiert, resultierend in dem Stamm IMW598. Dieser Stamm besitzt zusätzlich zur *dctS*-Insertionsmutation die *dctA-lacZ* Reporterengenfusion.

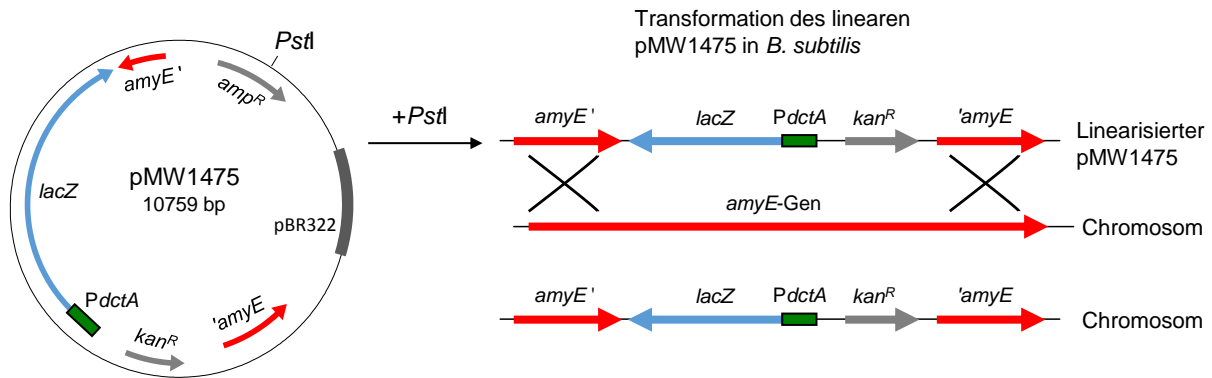


Abb. M8: **Transformation des linearisierten Plasmids pMW1475 in *B. subtilis* und homologe Rekombination des *dctA-lacZ* Reportergens in den *amyE*-Genlocus.** Das Plasmid ist ein Derivat des Vektors pAC7. Dieser Vektor kann nicht in *B. subtilis* repliziert werden, sondern dient lediglich zur homologen Rekombination von Reportergenen in den *amyE*-Genlocus. Der Vektor muss vor der Transformation in *B. subtilis* linearisiert werden.

Zur Untersuchung der Expression von *dctB* wurde mit den Primern IdctB-F und IdctB-R über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* eine *dctB-lacZ* Reportergenfusion in dem Vektor pMW1605 erstellt (Abb. M9). Hierfür wurde der Intergenbereich vor *dctB* (70 bp) sowie die ersten 386 bp des *dctS*-Gens und die ersten 24 bp von *dctB* amplifiziert.

Der Promotorbereich von *dctB* ist bisher nicht untersucht. *dctB* bildet jedoch ein gemeinsames Transkript mit *ydbD* (Asai et al., 2000), sodass der Promotorbereich in dem Intergenbereich vor *dctB* lokalisiert sein sollte. Der linearisierte Vektor pMW1605 wurde in *B. subtilis* 168 transformiert, der resultierende Stamm IMW599 enthält eine chromosomale *dctB-lacZ* Reportergenfusion. Außerdem wurde das linearisierte Plasmid in die *dctS*-Insertionsmutante IMW595 transformiert, der daraus resultierende Stamm ist der Stamm IMW600.

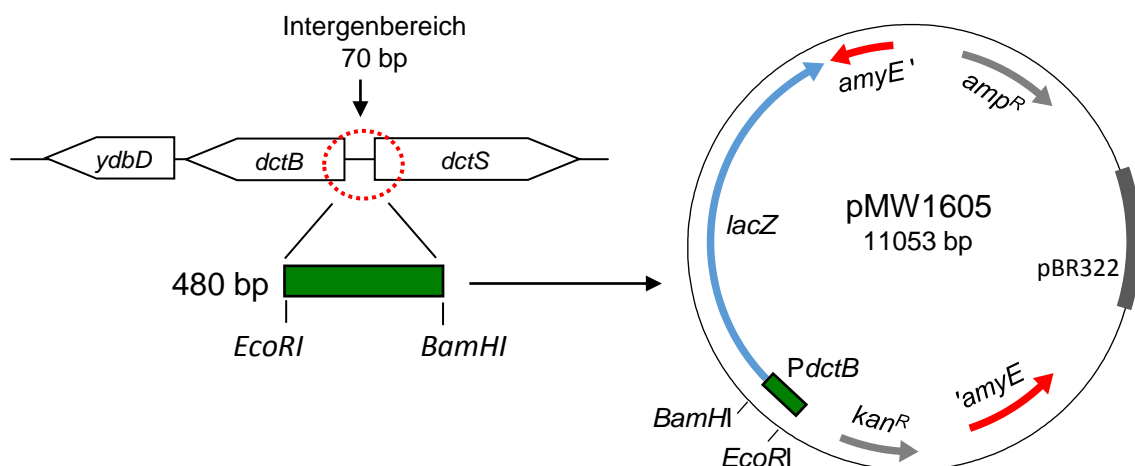


Abb. M9: **Konstruktion des Plasmids pMW1605 mit einer translationalen *dctB-lacZ* Reportergenfusion.** Das Plasmid ist ein Derivat des Vektors pAC7, welcher ein promotorloses *lacZ*-Gen besitzt. Der Promotorbereich von *dctB* wurde über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* vor das *lacZ*-Gen kloniert.

3.3.4 Amplifikation der *dcuS*, *dcuB* und *citA*-Promotorbereiche

Für Gelretardationsexperimente wurden die Promotorbereiche von *dcuS*, *dcuB* bzw. *citA* amplifiziert. Der *dcuS*-Promotorbereich (220 bp) wurde mit den Primern *dcuS_for* und *dcuS_rev* amplifiziert. Der *dcuB*-Promotorbereich mit einer Größe von 603 bp wurde mit den Primern *dcuB_for* und *dcuB_rev* amplifiziert. Die Amplifizierung des *citA*-Promotorbereichs (652 bp) erfolgte mit den Primern *citAB_for* und *citAB_rev*.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Protein-Protein Interaktionsstudien mittels mSPINE und mHPINE (Membrane Strep/His-Protein Interaction Experiment)

Die *in vivo* Interaktionsstudien mittels mSPINE wurden nach dem Prinzip von Müller et al. (2011) durchgeführt. Nach Cotransformation je eines Derivates des Vektors pASK-IBA3⁺ und des Vektors pBAD33 in *E. coli* C43 erfolgte die Zellzucht wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{578nm} von 1,3-1,5 gezüchtet. Für *in vivo* Crosslinking Experimente wurden die Zellen anschließend für 20 min bei 37 °C mit 0,6 % Formaldehyd inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min bei 6000 Upm, Beckman JA-10 Rotor, 4°C) geerntet und das Pellet in 2 x 20 ml Puffer A (20 mM Tris/HCl, pH 8) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels French Press in 3 Durchgängen bei 20000 Psi. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden abzentrifugiert (10 min bei 10000 Upm). Vom Überstand wurde die Membranfraktion mittels Ultrazentrifugation erhalten (65 min bei 45000 Upm, 4°C, Beckman Coulter Optima LE-80K, Rotor TFT 70.38). Die Membranfraktion wurde in 2 x 1 ml Puffer A für 45-60 min auf Eis mit einem Rührfisch homogenisiert. Anschließend wurde die Konzentration der Membranproteinfraktion auf 5 mg/ml eingestellt. Zur Solubilisierung der Membran wurden 2 % Empigen BB (N, N-Dimethyl-N-dodecylglycin-betain, 35 % in H₂O, Fluka) zugefügt. Zur Solubilisierung wurde die Lösung 30 min auf Eis gerührt. Anschließend wurde der Ansatz zur Abtrennung nicht solubilisierter Membrananteile zentrifugiert (50 min bei 50000 Upm, 4°C, Beckman Coulter Optima LE-80K, Rotor TFT 70.38). Der Überstand wurde in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverwendet. Die Membranproteine wurden aus der gelösten Membranfraktion mittels Affinitätschromatographie an einer Strep-Tactin Säule (1 ml Superflow Strep-Tactin Sepharose, IBA, Göttingen) bei 4°C isoliert. Nach Zugabe von 1-2 ml Strep-Tactin wurde die Säule mit 2 ml Puffer W äquilibriert. Das Solubilisat wurde in 1 ml-Schritten auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 2 x 5 ml Puffer W gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 3 x 1 ml Puffer E eluiert. Da dieser Puffer 0,05 % LDAO enthält, erfolgte auf der Säule ein Wechsel des Detergenz zur Solubilisierung der Membranfraktion. Das Detergenz LDAO soll Aggregaten bei der Isolierung

von Membranproteinen vorbeugen. Die Elutionsfraktionen 1-3 wurden durch Zentrifugation in Konzentratorröhrchen (Vivaspin 6, MWCO 10000, Sartorius stedim) auf ein Volumen von 100 µl aufkonzentriert. Die Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf einen Western-Blot übertragen und mittels Antikörper nachgewiesen. Zur Größenauftrennung von Proteinen, die durch Formaldehyd miteinander vernetzt wurden, wurde die kovalente Bindung zwischen den Proteinen und dem Crosslinker durch Aufkochen der Proben bei 95 °C für 20 min wieder aufgehoben.

Für *in vivo* Interaktionsstudien mittels mHPINE erfolgte die Zellzucht und die Isolation der Membranfraktion analog zu den mSPINE-Experimenten. Die Proteinisolation erfolgte mittels Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Säule (Nickel-Nitrilotriacetat-Säule, Qiagen). Das Säulenvolumen betrug 2 ml. Zunächst wurde die Säule mit 25 ml Puffer 3 äquilibriert. Die gelöste Membranfraktion wurde auf die Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend mit 15 ml Puffer 3 gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 3 x 1 ml Puffer 4 eluiert. Dieser Puffer enthält ebenso das Detergenz LDAO, sodass es auf der Säule zu einem Detergenzwechsel kommt. Die Elutionsfraktionen 1-3 wurden durch Zentrifugation in Konzentratorröhrchen (Vivaspin 6, MWCO 10000, Sartorius stedim) auf ein Volumen von 0,5–1 ml aufkonzentriert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf einen Western-Blot übertragen und mittels Antikörper nachgewiesen.

Western Blot und Antikörperfärbung

Zum immunologischen Nachweis von DctS, DctB und DctA wurden die Proteinproben auf einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mittels „semi-dry Blotting“ für 2 Stunden auf eine Nitrocellulosemembran (Protran, Schleicher & Schuell) geblottet (Towbin *et al.*, 1979). Dazu wurden 3 Streifen Whatman-Papier in Transferpuffer getaucht und auf die Kathode gelegt. Darauf wurde das SDS-Gel, die angefeuchtete Nitrocellulosemembran und 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier gelegt. Die zum Blotten eingesetzte Stromstärke war abhängig von der Fläche, die transferiert werden sollte und wurde folgendermaßen berechnet:

$$I \text{ [mA]} = \text{Höhe (Membran)} \times \text{Breite (Membran)} \times 0,8.$$

Die Stromstärke wurde dabei konstant gehalten. Anschließend wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler je nach Antikörperfärbung in Blocking-Puffer A (für Strep-Antikörper) oder Blocking-Puffer B (für Penta-His-Antikörper) gelegt, um freie Stellen auf der Membran abzusättigen. Die Membran wurde für 1 Stunde auf dem Taumelschüttler mit dem Strep-Antikörper in Antikörper-Lösung A (HRP-Konjugat, Verdünnung 1:10000-1:15000) oder mit dem Penta-His Antikörper in Antikörper-Lösung B

(HRP-Konjugat, Verdünnung 1:1000-1:3000) bei Raumtemperatur behandelt. Danach wurde die Membran 2 x 3 min in 10 ml Waschpuffer (für Strep-Antikörper) oder Blocking-Puffer B (für Penta-His-Antikörper) gewaschen. Anschließend wurde die Membran 2 x 3 min in 10 ml 1x PBS gewaschen. Der spezifisch an das Protein gebundene, HRP-gekoppelte (= horseradish peroxidase) Antikörper wurde durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Für diesen Nachweis wurde das Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat (Millipore) verwendet. 500 µl des Luminol Reagenzes wurden mit 500 µl der dazugehörigen Peroxidlösung gemischt und auf den Blot aufgetragen. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte mit einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL).

3.4.2 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität in *E. coli*: BACTH-Messungen und *in vivo* Komplementationsstudien

Die *in vivo* Interaktionsstudien mittels des Bacterial Two-Hybrid (BACTH)-Systems wurden nach Karimova et al. (1998) durchgeführt. Das BACTH-System beruht auf der funktionalen Rekonstitution der Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis*. Die zwei Fragmente der Adenylatzyklase T18 und T25 sind an je ein Protein fusioniert, die in dem Adenylatzyklase-negativen *E. coli* Stamm BTH101 coexprimiert werden (Karimova et al., 1998). Elektrokompente Zellen von BTH101 (50 µl) wurden mit je 10-20 ng eines T18-Fusionsplasmids und eines T25-Fusionsplasmids transformiert und auf LB-KAXI Platten ausplattiert. Anschließend wurde die Interaktion der Proteine qualitativ durch Blaufärbung des Agars und quantitativ über die Aktivität der β -Galaktosidase LacZ bestimmt. Bei Interaktion der Proteine ist die Adenylatzyklase aktiv und bildet cAMP, welches an einen cAMP/CRP-abhängigen Promotor bindet, der mit einem *lacZ*-Gen fusioniert ist. Für die Messung der β -Galaktosidaseaktivität wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben gezüchtet. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde mit dem chromogenen Substrat ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG) nach Miller et al. (1992) bestimmt. Das Enzym β -Galaktosidase spaltet ONPG in Galaktose und ortho-Nitrophenol. Die Bildung von ortho-Nitrophenol kann bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen werden und ist damit ein Maß für die Aktivität der β -Galaktosidase. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde in Miller-Units (MU) angegeben und nach folgender Formel berechnet:

$$[\text{MU}] = 1000 \times \Delta E_{420\text{nm}} (\text{Probe}) / t [\text{min}] \times V (\text{Probe}) [\text{ml}] \times \Delta \text{OD}_{578\text{nm}} (\text{Probe})$$

Für *in vivo* Komplementationsstudien mit der Sensorkinase DctS_{Gk} wurde die Aktivität einer *dcuB*- bzw. *dctA-lacZ* Reporterfusion in *E. coli* gemessen. Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurde ebenso nach Miller et al (1992) durchgeführt.

Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität in *B. subtilis*

Für die Messung aerober *dctA-lacZ* Reporter-genaktivitäten in *B. subtilis* wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.1 bis zu einer OD_{578nm} von 1,3-1,6 gezüchtet. Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurde wie in *E. coli* nach Miller et al. (1992) durchgeführt. Der Aufschluss der Zellen vor der Messung erfolgte jedoch nach einer anderen Methode und wurde wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Nach Zucht der Zellen wurden 2 ml der Kultur abzentrifugiert (13000 Upm, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 600 μ l Z-Puffer + 30 μ l Lysozym/Dnase-Mix (LD-Mix) resuspendiert und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der nicht aufgeschlossenen Zellen (2 min, 13000 Upm, 4°C) wurde der Überstand (=Zellextrakt) in ein neues Gefäß gegeben. Zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurden 100 μ l des Zellextraktes mit 700 μ l Z-Puffer vermischt.

3.4.3 Transportmessungen in *B. subtilis*

Für Messungen des Transports von [14 C]-Succinat in *B. subtilis* wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben gezüchtet und nach der Zellernte in eiskaltem Puffer TI resuspendiert und auf eine OD_{578nm} von 8 eingestellt. Die Transportmessungen wurden bei 37 °C durchgeführt. Es wurden 360 μ l der Zellsuspension für 10 min bei 37 °C vorgewärmt und mit 360 μ l 40 μ M [14 C]-Succinat (Moravec Biochemicals, Brea, CA; 44 μ Ci/mmol) inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurden pro Ansatz 100 μ l Lösung mit 900 μ l eiskaltem 0,1 M LiCl gestoppt und anschließend unter Vakuumfiltration (Hoefer FH225V Ten-Place Filter Manifold, Pharmacia Biotech) auf einen Glasfaserfilter (APFF, 25 mm Durchmesser, Porengröße 0,7 μ m; Millipore, Billerica, MA) transferiert. Unmittelbar nach dem Transfer der Zellen auf den Filter wurden diese zweimal mit 1 ml 0,1 M LiCl gewaschen. Die Filter wurden in 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus LSC Universalcocktail; Roth, Karlsruhe, Germany) aufgelöst und die Radioaktivität r [dpm] wurde im Szintillationszähler (Liquid Scintillation System, LS 6000SC, Beckman) gemessen. Als Leerwert für unspezifische Aufnahme wurde die Radioaktivität r_0 einer 50 μ l Zellsuspension gemessen, die direkt in die Stopplösung pipettiert und mit 50 μ l [14 C]-Succinat versetzt wurde. Die Aktivität α der für die Messungen verwendeten [14 C]-Succinat-Lösung wurde vor jeder Messung bestimmt und lag bei 4000-5000 dpm/nmol. Es wurden mindestens 3 unabhängige Transportmessungen in jeweils 2 Wiederholungen durchgeführt. Die Aufnahmeaktivität in μ mol/g TG (= Trockengewicht) wurde nach folgender Formel berechnet:

Aufnahme an [14 C]-Succinat in [μ mol/g TG] = $(r - r_0) / (\alpha * OD_{600} * 281 \text{ g/l} * 100 \mu\text{l})$.

3.4.4 Expression und Reinigung von DcuS-ähnlichen Sensorkinasen

Die heterologe Expression von DcuS-ähnlichen Sensorkinasen erfolgte nach Transformation in *E. coli* C43(DE3). Die Sensorkinasen wurden in dem Vektor pET28a exprimiert und besitzen zur Isolation des Proteins einen N-terminalen His₆-Anhang (vgl. 3.3.2, S. 40). Die Zellzucht erfolgte wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 6000 Upm, Beckman JA-10 Rotor, 4°C) geerntet. Das Pellet wurde in 20 ml Puffer 1 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 20 ml Puffer 1 aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels French Press in 2 Durchgängen bei 20000 Psi. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden abzentrifugiert (10 min bei 10000 Upm). Vom Überstand wurde die Membranfraktion mittels Ultrazentrifugation erhalten (65 min bei 45000 Upm, 4°C, Beckman Coulter Optima LE-80K, Rotor TFT 70.38). Die Membranfraktion wurde in Waschpuffer gewaschen und in Puffer 2 im Potter S (Braun, Melsungen) homogenisiert. Pro g Nassgewicht der Membran wurden 10 ml Puffer 2 verwendet. Zur Solubilisierung der Membran wurden 2 % Empigen BB (N, N-Dimethyl-N-dodecylglycin-betain, 35 % in H₂O, Fluka) zugefügt. Zur Solubilisierung wurde die Lösung 30 min auf Eis gerührt. Anschließend wurde der Ansatz zur Abtrennung nicht solubilisierter Membrananteile zentrifugiert (50 min, 50000 Upm, 4°C, Beckman Coulter Optima LE-80K, Rotor TFT 70.38). Der Überstand wurde in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverwendet. Die Proteine wurden aus der gelösten Membranfraktion mittels Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Säule (Nickel-Nitrilotriacetat-Säule, Qiagen) isoliert. Das Säulenvolumen betrug 2 ml. Zunächst wurde die Säule mit 25 ml Puffer 3 äquilibriert. Die gelöste Membranfraktion wurde auf die Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend mit 15 ml Puffer 3 gewaschen. Da der Puffer 3 0,04 % LDAO enthält, erfolgte auf der Säule ein Wechsel des Detergenz zur Solubilisierung der Membranfraktion. Das Detergenz LDAO soll Aggregaten bei der Isolierung von Membranproteinen vorbeugen. Das gebundene Protein wurde mit 6 ml Puffer 4 eluiert und zu Fraktionen von je 1ml gesammelt.

3.4.5 Rekonstitution von His₆-DctS_{Gk} in Liposomen

Die Sensorkinase His₆-DctS_{Gk} wurde in einem Protein:Lipid Verhältnis von 1:20 (w/w) in Liposomen bestehend aus *E. coli* Phospholipiden (21 mM *E. coli* Polar Lipid Extract, Avanti Polar Lipids) rekonstituiert. Zunächst wurden 100 mg der Phospholipide (20 mg/ml in Chloroform) im Rotationsverdampfer getrocknet und in 5 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 mit 80 mg N-Octyl-β-D-Glucopyranosid (Gerbu) gelöst. Zur Entfernung des Detergenz und Bildung von Liposomen aus den Phospholipiden wurde die Lösung über Nacht gegen 3 x 1 Liter 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 dialysiert. Um unilamellare Liposomen zu erhalten, wurde die entstandene Liposomensuspension dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Für die Rekonstitution wurden die Phospholipide mit

dem Detergenz Triton X-100 destabilisiert. Dabei wurde ein Detergenz:Lipid Verhältnis (R_{eff}) von 2,5 eingehalten (Rigaud et al., 1988; 1995). Die verwendete Detergenzkonzentration D_t wurde nach Paternostre et al. (1988) mit folgender Formel berechnet:

$$D_t = D_a + R_{\text{eff}} [\text{Lipid}]$$

D_a : Konzentration des monomeren Detergenz in der wässrigen Phase (0,18 mM für Triton X100)

[Lipid]: Lipidkonzentration (21 mM)

Zu den destabilisierten Liposomen wurde die Proteinlösung zugegeben und für 15 min bei 20 °C auf dem Taumelschüttler inkubiert. Anschließend wurden zur Entfernung des Detergenz Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad) zugegeben (Holloway, 1973). Vor der Zugabe der Bio-Beads wurden diese in 50 mM Tris/HCl, pH 7,7 aufgenommen und zur Entfernung von Luftblasen unter Rühren anaerobisiert. Pro mg Triton X-100 wurden 5 mg Bio-Beads zugegeben. Die Lösung wurde für 2 Stunden bei 4°C auf dem Taumelschüttler inkubiert und anschließend erfolgte eine erneute Zugabe derselben Menge an Bio-Beads. Nach Inkubation der Lösung über Nacht bei 4 °C erfolgte eine weitere Zugabe der Bio-Beads mit 1-stündiger Inkubation bei 20 °C. Nicht rekonstituierte Anteile wurden durch Ultrazentrifugation in 1 ml Ultrazentrifugationsröhrchen abgetrennt (50000 Upm, 45 min, 4 °C, Kontron TFT 70.38 Rotor). Nach zweimaligem Waschen der Proteoliposomen in 50 mM Tris/HCl, pH 7,7 (50000 Upm, 15 min, 4 °C, Kontron TFT 70.38 Rotor) wurden diese in der gewünschten Konzentration in Puffer R aufgenommen. Die Proteoliposomen wurden dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und beim letzten Einfrierzyklus bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.6 Nachweis der Rekonstitution durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Für den Nachweis der Rekonstitution von DctS_{Gk} in Liposomen wurde eine Saccharosedichtegradientenultrazentrifugation durchgeführt. Mit dieser erfolgt über einen ansteigenden Saccharosegehalt von 0-45 % eine Trennung des membranintegralen Proteins von löslichem Protein sowie Proteinaggregaten. Zur Herstellung des Saccharosedichtegradienten wurden aus einer steriltfiltrierten Stammlösung (50 % Saccharose in 50 mM Tris/HCl, pH 7,7) Konzentrationen von 0, 10, 20 und 45 % Saccharose in 50 mM Tris/HCl, pH 7,7 angesetzt. Die verschiedenen Konzentrationen wurden nacheinander zu je 1,1 ml mit einer Pasteurpipette in Gradientenröhrchen (OptiSeal Tubes, Beckman Coulter) pipettiert. Dabei wurde mit der niedrigsten Konzentration an Saccharose begonnen und die jeweils höhere Konzentration unterschichtet. Auf die oberste Schicht (1,1 ml 0 % Saccharose) wurden 0,5 ml der Proteinprobe pipettiert und anschließend für 3 Stunden bei 45000 Upm in

einem Vertikalrotor (VTI65, Beckman Coulter) in einer Coulter Optima LE-80K Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) bei langsamer Beschleunigung und Abbremsung zentrifugiert. Anschließend wurden 9 Fraktionen mit jeweils 0,5 ml gesammelt. Von jeder Fraktion wurden 20 µl mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

3.4.7 Phosphorylierung von DctS_{Gk} und DcuS_{Ec}

Zur Bestimmung der Kinaseaktivität von DctS_{Gk} und DcuS_{Ec} wurden je 25 µg des rekonstituierten oder solubilisierten Proteins in Phosphorylierungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂) mit oder ohne Zugabe von C₄-Dicarbonsäuren (20 mM) in einem Endvolumen von 60 µl aufgenommen. Zur homogenen Verteilung des Puffers im Lumen und der Umgebung der Proteoliposomen wurde der Ansatz dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Zur verbesserten Assemblierung der Proteoliposomen wurde der Ansatz 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für die qualitative Bestimmung der Radioaktivität mit Hilfe eines Phosphoimagers wurde die Autophosphorylierung durch Zugabe von 0,1 µM unverdünntem [³³P]-ATP (110 TBq/mmol, Hartmann Analytic) gestartet und für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 µl SDS-Auftragspuffer gestoppt. Die Proben wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde mit Saranfolie bedeckt und für 16-48 Stunden auf einer Phosphor Imaging Platte (BAS-MP2040, Fujifilm) in völliger Dunkelheit exponiert. Die Radioaktivität wurde anschließend mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fluorescent Imagereader FLA7000, Fujifilm, Düsseldorf) detektiert. Für die quantitative Bestimmung der Radioaktivität wurde die Autophosphorylierung durch Zugabe von 0,1-10 mM [³³P]-ATP (ATP-Mix aus 0,1-10 mM kaltem ATP unter Zugabe von 5 µl heißem ATP) gestartet und für 0-30 min inkubiert. Die Reaktion wurde ebenfalls durch Zugabe des SDS-Auftragspuffers gestoppt. Die Proben wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, für 30 min mit Coomassie gefärbt und mit Entfärbelösung entfärbt. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die Proteinbanden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, in 500 µl 30 %igem H₂O₂ aufgelöst (über Nacht bei 40 °C) und anschließend in 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus LSC Universalcocktail; Roth, Karlsruhe, Germany) aufgenommen. Vor der Messung im Szintillationszähler wurden die Proben 3 Stunden auf dem Taumelschüttler inkubiert, um die vollständige Auflösung der SDS-Gelstücke zu gewährleisten. Die Radioaktivität der SDS-Gelbanden wurde im Szintillationszähler (Liquid Scintillation System, LS 6000SC, Beckman) bestimmt. Zur Bestimmung des radioaktiven Hintergrunds wurden SDS-Gelstücke ober- und unterhalb der Proteinbanden ausgeschnitten und die Radioaktivität bestimmt. Diese wurde als Blindwert von der gemessenen Radioaktivität der Proteinbanden abgezogen. Der Anteil an phosphoryliertem DctS_{Gk} bzw. DcuS_{Ec} wurde aus der spezifischen Radioaktivität der [³³P]-ATP-Lösung berechnet und auf die eingesetzte Gesamtmenge des Proteins bezogen.

3.4.8 Gelretardation von DNA-Promotorbereichen: Electromobility Shift Assays (EMSA)

Zur Untersuchung der *in vitro* Bindung von DcuR an die Promotorbereiche von *dcuS*, *dcuB* bzw. *citA* wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Hierfür wurde zunächst His₆-DcuR in dem Vektor pMW180 produziert und gereinigt. Da DcuR bei der Proteinreinigung zur Bildung von „inclusion bodies“ neigt und daher ein beträchtlicher Teil als unlösliches Protein verloren geht, wurde für die Reinigung von His₆-DcuR ein optimiertes Protokoll verwendet (Janausch et al., 2004). Dabei war es wichtig, dass während des Elutionsprozesses bei Ni²⁺-NTA Säulenreinigung die Konzentration der eluierten Proteinfraktion 0,6 mg/ml nicht überschreitet. Dies wurde durch Elution des Proteins in 10 ml vorgelegten Puffer erreicht. Dadurch wurde das Protein direkt bei der Elution 1/10 verdünnt. Der Puffer enthielt 40 % Glycerin, was zu einer Stabilisierung von His₆-DcuR führte. Da das Protein dennoch nicht länger als 1 bis 2 Tage stabil blieb, wurden die EMSA-Tests mit frisch gereinigtem His₆-DcuR durchgeführt. Die Gelretardationsexperimente wurden nach Janausch et al (2004) durchgeführt. Vor dem Test wurden 10 µg His₆-DcuR in 1-fachem PH-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7, 5mM MgCl₂, 1mM DTT) durch 60-minütige Inkubation mit 50 mM Acetylphosphat bei 37 °C phosphoryliert. 0-4 µM phosphoryliertes His₆-DcuR wurde mit 5 nM der jeweiligen Promotor-DNA in 1-fachem BP-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5,5 % Glycerin, 0,1 mM EDTA, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 mg/ml salmon sperm DNA) für 20 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit nativem DNA-Auftragspuffer (50 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 10 % Glycerin) versetzt und die DNA in einem nicht-denaturierenden 5 %igen Polyacrylamidgel in Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer aufgetrennt (Sambrook und Russell, 2001). Das DNA-Gel wurde mit SYBR-Green I (Sigma-Aldrich) in 20 ml TBE-Puffer 1:500-1:1000 verdünnt für 45 min gefärbt und die DNA-Banden unter dem UV-Leuchttisch detektiert.

3.5 Bioinformatische Methoden

Datenbanken

E. coli: EcoCyc

<http://www.ecocyc.org/>

B. subtilis: BioCyc

<http://biocyc.org/>

G. kaustophilus:

<http://www.jamstec.go.jp/gbrowser/cgi-bin/mapPage.cgi?org=gka>

NCBI:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Uniprot:

<http://www.uniprot.org/>

Primärsequenzvergleiche

ClustalW2

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

BLAST

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Spidey

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/>

Sekundärstrukturvorhersage

PSIPRED:

<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

Topologievorhersagen

TMHMM:

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

OCTOPUS

<http://octopus.cbr.su.se/>

TOPCONS

<http://topcons.cbr.su.se/>

TRAP-Transportsysteme

TRAP-Datenbank:

<http://www.trapdb.org/>

3D-Strukturvorhersagen

SWISS-MODEL:

<http://swissmodel.expasy.org/>

Visualisierung von 3D-Strukturen

Chimera:

<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

4 Ergebnisse

4.1 Bildung eines trimeren DctS / DctA / DctB-Komplexes für die Erkennung von C₄-Dicarbonsäuren in *Bacillus subtilis*

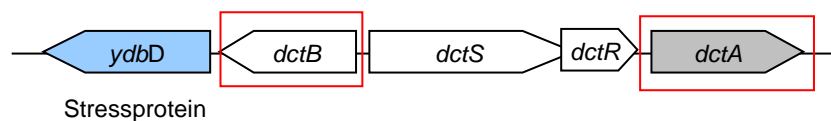
Zweikomponentensysteme spielen in Bakterien eine essentielle Rolle zur Erkennung von Umweltreizen. Diese sind typischerweise aus einer Sensorkinase sowie einem Responseregulator aufgebaut. Die Sensorkinase dient der Reizdetektion und Signalweiterleitung in die Zelle, während der Responseregulator meist als Transkriptionsfaktor fungiert. Die Funktion vieler Zweikomponentensysteme ist abhängig von einer oder mehreren weiteren Komponenten (Tetsch und Jung, 2009). Häufig fungieren Transportproteine oder auch extrazelluläre Bindeproteine, die meist ein Zielgen des Zweikomponentensystems darstellen, als Cosensoren. Dem DcuSR-Zweikomponentensystem aus *E. coli* dienen die Transporter DctA unter aeroben und DcuB unter anaeroben Bedingungen als Cosensoren (Witan et al., 2012a; 2012b). Das DcuSR-System kontrolliert in *E. coli* die Expression der Gene für die Fumaratatmung bzw. des aeroben C₄-Dicarboxylat-Transporters DctA. In *B. subtilis* existiert ein zu DcuSR homologes Zweikomponentensystem zur aeroben Erkennung der C₄-Dicarbonsäuren Fumarat und Succinat. Dieses besteht aus der Sensorkinase DctS und dem Responseregulator DctR und kontrolliert die Expression des aeroben Transporters DctA (Asai et al., 2000). Genetische Untersuchungen zeigen, dass für die Expression von *dctA* die Anwesenheit des Bindeproteins DctB notwendig ist (Asai et al., 2000). Daher wird DctB als Cosensor für die DctS-Sensorkinase diskutiert. Die Deletion von *dctA* beeinflusst ebenso die Expression des Transporters. In dieser Arbeit soll die Interaktion zwischen den Komponenten DctS, DctB und DctA aus *B. subtilis* mittels *in vivo* Interaktionsstudien untersucht und eine mögliche Cosensor-Funktion von DctB und/oder DctA geklärt werden.

4.1.1 Das Bindeprotein-abhängige C₄-Dicarboxylat-System aus *Rhodobacter capsulatus* im Vergleich zu *B. subtilis*

Das DctSR-System aus *B. subtilis* kontrolliert die Expression des aeroben C₄-Dicarboxylat-Transporters DctA (Asai et al., 2000) und vermutlich des Bindeproteins DctB. Die Anwesenheit von DctA sowie DctB ist für die korrekte Funktion des Zweikomponentensystems notwendig. Die *dctA*-Expression wird durch die C₄-Dicarbonsäuren Fumarat und Succinat über DctSR induziert (Asai et al., 2000). Die *dct*-Gene sind im Chromosom von *B. subtilis* direkt benachbart lokalisiert (Abb. E1). Die Gene *dctS* und *dctR* werden kotranskribiert, während das stromabwärts von *dctR* kodierte *dctA*-Gen einen eigenen Promotor besitzt (Asai et al., 2000). *dctA* kodiert für einen Transporter, der im Symport mit 3 Protonen für die Aufnahme der C₄-Dicarbonsäuren Fumarat, Succinat, Malat und Oxalacetat verantwortlich ist (Groeneveld et al.,

2010). Der Transporter DctA ist homolog zu DctA aus *E. coli* (DctA_{Ec}) und besitzt eine Sequenzidentität von 53 % zu diesem. Stromaufwärts von *dctS* befindet sich in umgekehrter Orientierung *dctB*, welches mit *ydbD* ein Operon bildet (Asai et al., 2000, Abb. E1). *YdbD* ist ein bisher uncharakterisiertes Protein, welches für eine potentielle Mangan-Katalase (Mn-Katalase) kodiert. DctB zeigt 37 %ige Sequenzidentität zu dem periplasmatischen Bindeprotein DctP aus *Rhodobacter capsulatus* (Abb. E2). DctP bildet zusammen mit den Membrankomponenten DctQ und DctM ein TRAP- (Tripartite ATP-independent periplasmic) Transportsystem zur hochaffinen Aufnahme der C₄-Dicarbonsäuren L-Malat, Succinat, Fumarat und D-Malat (Forward et al., 1997). TRAP-Transporter sind sekundär aktiv, verfügen aber wie die primär aktiven ABC-Transporter über ein Substratbindeprotein (DctP), welches das Substrat dem Transporter zuführt. *dctP* wird mit *dctQ* und *dctM* kotranskribiert (Abb. E1) und die Expression des *dctPQM*-Operons wird durch das Zweikomponentensystem DctSR und C₄-Dicarbonsäuren induziert (Hamblin et al., 1993). Die Gene *dctSR* sind stromaufwärts von *dctP* lokalisiert und bilden ein Operon.

Bacillus subtilis



Rhodobacter capsulatus

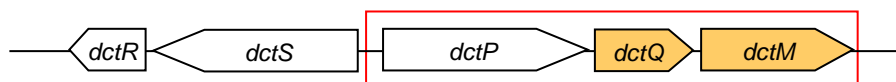


Abb. E1: **Organisation und Vergleich der Gene des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels von *Bacillus subtilis* und *Rhodobacter capsulatus*.** Die rote Markierung der Gene zeigt die Lokalisation des Bindeproteins DctB bzw. DctP und der Transportproteine an.

Im Gegensatz zum DctPQMSR-System aus *R. capsulatus* ist DctB in *B. subtilis* nicht assoziiert mit einem Transporter des TRAP-Typs. Mutationsanalysen weisen auf eine Beteiligung von DctB als Cosensor für die DctS-Sensorkinase hin (Asai et al., 2000). Extrazelluläre Bindeproteine sind in ihrer Primärsequenz wenig konserviert und zeigen nur bei Bindung gleicher Liganden eine Sequenzidentität von über 20 % (Kelly und Thomas, 2001; Mulligan et al., 2011). DctP-homologe Bindeproteine können über eine für diese Proteinfamilie charakteristische Signatursequenz identifiziert werden (Rabus et al., 1999). In DctB ist diese Sequenz mit Ausnahme des Restes T171 vollständig konserviert (Abb. E2). Im Gegensatz zur geringen Ähnlichkeit der Primärstruktur von Bindeproteinen zeigen diese eine hohe Konservierung der Sekundär- und Tertiärstruktur (Kelly und Thomas, 2001; Mulligan et al., 2011). Ein Vergleich der Sekundärstrukturvorhersage von DctB mit DctP ergab eine nahezu identische Abfolge der α -Helices und β -Faltblätter (Abb. E2). Die Existenz der DctP-typischen

Signatursequenz in DctB sowie die Ähnlichkeit der vorhergesagten Sekundärstrukturen und die vergleichsweise hohe Sequenzidentität von DctB zu DctP (37 %) lassen dieses als ein zur DctP-Familie gehöriges Bindeprotein identifizieren.

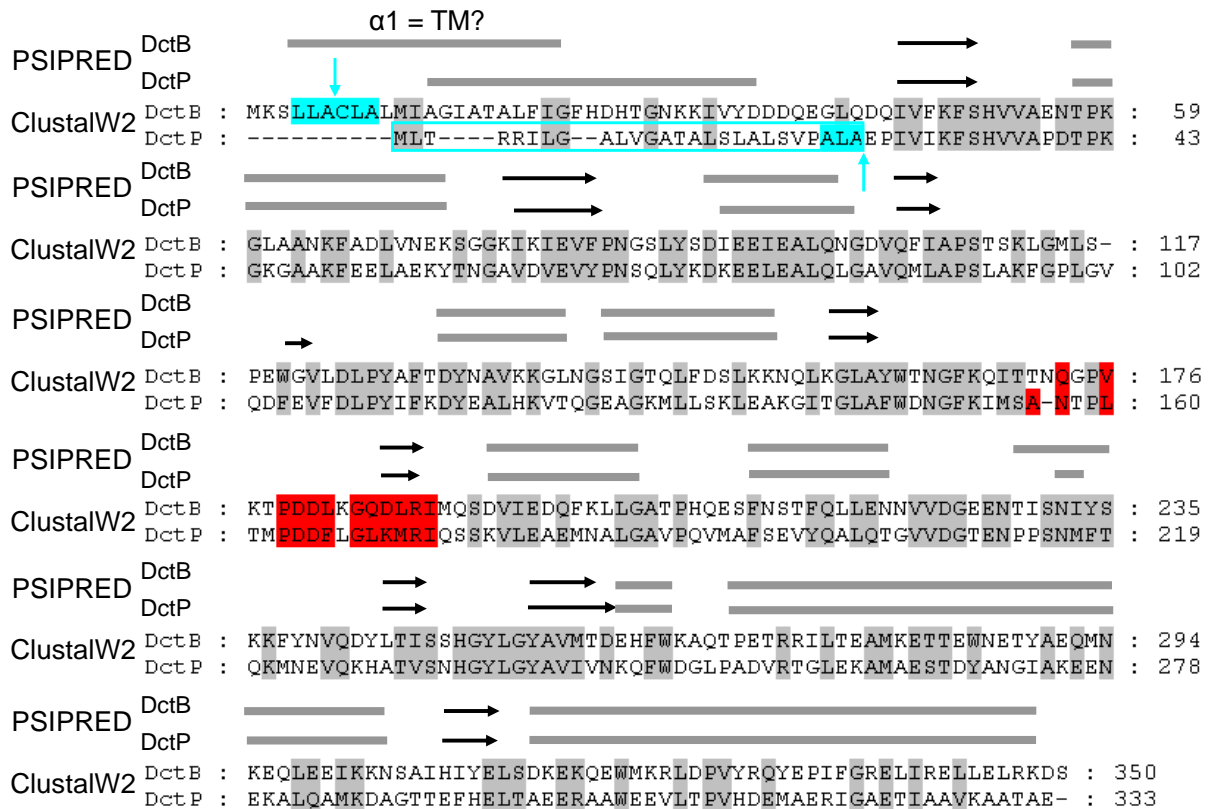


Abb. E2: Vergleich der Primärsequenz und der vorhergesagten Sekundärstruktur von DctB aus *Bacillus subtilis* mit DctP aus *Rhodobacter capsulatus*. Sequenzähnlichkeiten laut ClustalW2 (Larkin et al., 2007) sind grau unterlegt. Die Sekundärstrukturanalysen erfolgten über das Programm PSIPRED (Jones, 1999). α -Helices sind als graue Balken, β -Faltblätter als Pfeile dargestellt. Die Konsensussequenz grampositiver Lipoproteine mit der potentiellen Spaltstelle ist am N-terminus von DctB blau unterlegt (L-Y-Z-Spaltstelle-C-y-z; Y = A, S, V, Q oder T; Z = G oder A; y = S, G, A, N, Q oder D; z = S, A, N oder Q; Gilson et al., 1988, Yamaguchi und Inouye, 1988). Die Signalsequenz für den Export von DctP ins Periplasma (Shaw et al., 1991) ist ebenfalls blau unterlegt. Die Spaltstelle ist mit einem blauen Pfeil markiert, das konservierte Sequenzmotiv AXA (X = beliebige Aminosäure; Perlman und Halvorson, 1983), welches sich direkt vor der Spaltstelle befindet, ist blau markiert. Die Signatursequenz zur Identifizierung von Bindeproteinen des DctP-Typs (Rabus et al., 1999; [SANF] – [RKNSQ] X (2) – [LIV] X (2) – [LIVWPF] – [ADES] – [DHE] – [LIVMF] – X-G – [LQM] – [KRD] – [LIVM] – R – [LIVTA], X = beliebiger Rest, alternative Reste in Klammern) ist rot unterlegt.

DctP aus *R. capsulatus* ist ein rein periplasmatisches Bindeprotein, welches N-terminal eine typische Signalsequenz für periplasmatische Proteine besitzt (Abb. E2). Topologievorhersagen für DctB aus *B. subtilis* zeigen, dass das Bindeprotein eine vorhergesagte Transmembranhelix am N-Terminus besitzt (Abb. E2). Der hydrophobe Bereich am N-Terminus des Proteins könnte jedoch auch eine Signalsequenz für ein Lipoprotein darstellen (Abb. E2). Extrazelluläre Bindeproteine sind in grampositiven Bakterien meist als Lipoprotein an die Membran verankert (Gilson et al., 1988; Sutcliffe und Harrington, 2002). Lipoproteine besitzen ähnlich wie periplasmatische Proteine gramnegativer Bakterien eine

Signalsequenz bestehend aus einer kurzen, positiv geladenen N-Region, einer hydrophoben H-Region und einer C-Region, die meist kleine, ungeladene Reste sowie die Spaltstelle für eine Peptidase enthält (Sutcliffe und Harrington, 2002; Bagos et al., 2009). Essentiell ist hierbei ein Cystein-Rest am C-Terminus der Signalsequenz. Zur Verankerung des Proteins an die Membran wird eine Thioether-Bindung zwischen der Sulfhydrylgruppe des Cysteins und eines Diacylglycerids ausgebildet (Bagos et al., 2009). Eine Vorhersage von DctB mit Hilfe des PRED-LIPO Servers zur Vorhersage von Lipoprotein-Signalsequenzen (Bagos et al., 2009) zeigt eine mögliche Signalsequenz im Bereich der Aminosäuren 1 bis 24. Weitere Vorhersagen geben ein mögliches Signalpeptid zwischen Position 1 und 18 an mit einer Spaltstelle zwischen Aminosäure 18 und 19 (SignalP-, LipoP 1.0-Server). Da in diesem vorhergesagten Bereich kein Cystein-Rest folgt, ist das Vorhandensein eines Signalpeptids an diesen Stellen unwahrscheinlich. DctB besitzt einen Cystein-Rest an Position 7, welcher von einer Konsensussequenz grampositiver Lipoproteine umgeben ist (Gilson et al., 1988, Asai et al., 2000; Abb. E2). Jedoch fehlt auf Grund der Position des Cystein-Restes die typische Abfolge der N-, H- und C-Region eines Signalpeptids, da der größte Teil des hydrophoben Bereiches C-Terminal des Cys-Restes liegt. Somit ist eine N-terminale Transmembranhelix in DctB wahrscheinlich.

4.1.2 *In vivo* Interaktion zwischen DctS, DctB und DctA: mSPINE/mHPINE und BACTH

Die direkte Interaktion von DctB mit der Sensorkinase DctS bzw. dem Transporter DctA wurde *in vivo* mittels mSPINE (Membrane Strep-Protein Interaction Experiment) (Müller et al., 2011) und mHPINE (Membrane His-Protein Interaction Experiment) untersucht. Die mSPINE Methode beruht auf der Coexpression potentieller Interaktionspartner in *E. coli* und der Reinigung einer der Interaktionspartner mittels eines Streptavidin-Anhangs (= Strep-Anhang), während das zweite Protein ohne den entsprechenden Anhang versehen ist (Abb. E3). Es kommt nur dann zur Bindung des Proteins ohne Strep-Anhang an eine Strep-Tactin Affinitätssäule, wenn die Proteine miteinander interagieren und daher in räumlicher Nähe sind. In einem Immunoblot kann nachgewiesen werden, ob sich beide Proteine in der Elutionsfraktion nach Strep- Reinigung befinden (Abb. E3). Die mHPINE Methode funktioniert nach dem gleichen Prinzip mit dem Unterschied, dass einer der Interaktionspartner einen His₆-Anhang enthält und die Proteinreinigung über eine Ni²⁺-NTA (Nickel-Nitriloacetat) Affinitätssäule erfolgt. Die Coexpression der Proteine für mSPINE- und mHPINE-Untersuchungen erfolgte von zwei getrennten Plasmiden. Ein Interaktionspartner wurde von einem Derivat des Vektors pASK-IBA3plus exprimiert, welcher einen Strep-Anhang zur Fusion an den C-Terminus des Proteins sowie einen mit Anhydrotetracyclin induzierbaren Promotor enthält.

Die Expression des zweiten Interaktionspartners erfolgte von einem Derivat des Vektors pBAD33 mit einem C-terminalen His₆-Anhang sowie einem mit Arabinose-induzierbaren Promotor (Abb. E3). Nach Coexpression der Proteine in *E. coli* kann ein *in-vivo*-Crosslink mittels Formaldehyd durchgeführt werden.

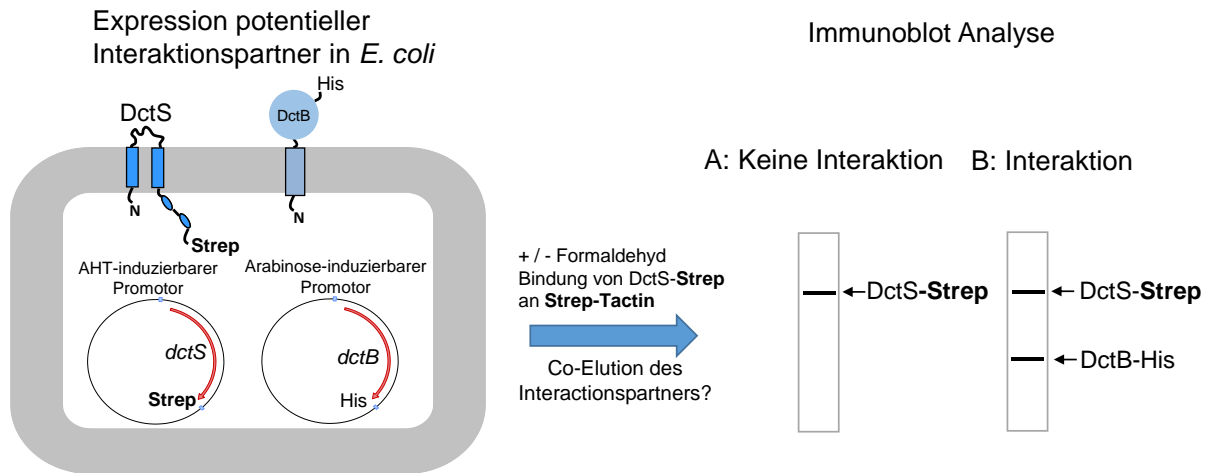


Abb. E3: **Interaktionsstudien zweier Proteine mittels der mSPINE-Methode am Beispiel von DctS-Strep und DctB-His.** Das Prinzip der mHPINE-Methode ist identisch zu mSPINE, mit Ausnahme der Reinigung des einen Interaktionspartners über einen His₆-Anhang, während der zweite Interaktionspartner keinen His₆-Anhang enthält.

Dabei werden bei räumlicher Nähe zweier Proteine diese über eine Methylengruppe miteinander verknüpft (Abb. E4; Nadeau und Carlson, 2007; Sutherland et al., 2008). Da Formaldehyd ein Crosslinker mit einer sehr geringen Länge von 2,7 Å ist, können mit diesem nur direkt miteinander interagierende Proteine vernetzt werden. Die kovalente Vernetzung der Proteine durch Formaldehyd ist durch Aufkochen der Proben reversibel, sodass die einzelnen Proteine im SDS-Gel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden können.

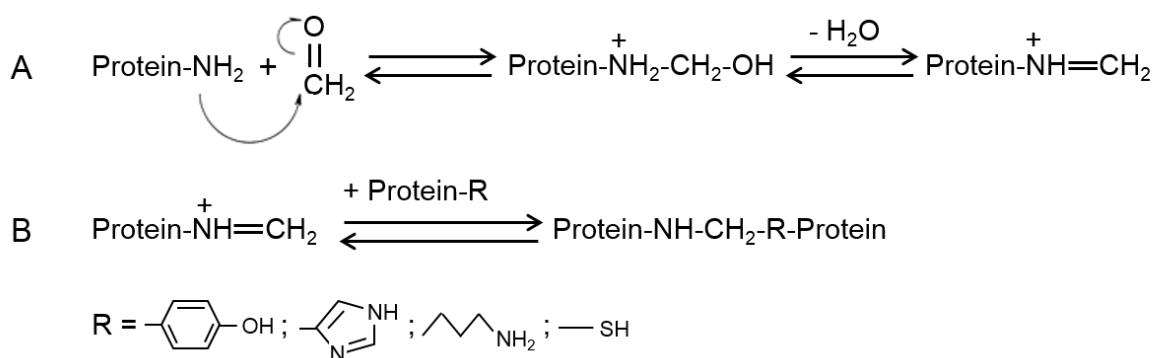


Abb. E4: **Reaktionsschema der Bildung eines Formaldehyd-Crosslinks zweier Proteine (nach Nadeau und Carlson, 2007).** (A) Reaktion eines primärenamins mit Formaldehyd und Bildung eines reaktiven Immonium-Kations. (B) Nucleophiler Angriff eines zweiten Proteins (durch ein primäres Amin, eine Sulfhydryl-, Phenol- oder Imidazolgruppe) an das Immonium-Kation und Bildung einer Methylenebrücke zwischen Protein 1 und Protein 2.

Als zweite unabhängige Methode wurden Interaktionsstudien zwischen DctS, DctB und DctA mittels eines Bacterial Two-Hybrid (BACTH)-Systems durchgeführt. Das BACTH-System beruht auf der funktionalen Rekonstitution der Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis*. Die zwei Fragmente der Adenylatzyklase T18 und T25 sind an je ein Protein fusioniert, die in dem Adenylatzyklase-negativen *E. coli* Stamm BTH101 coexprimiert werden (Karimova et al., 1998). Bei Interaktion der beiden Proteine befinden sich die zwei Fragmente der Adenylatzyklase in räumlicher Nähe und es kann ein funktionales Enzym gebildet werden. Dieses synthetisiert cAMP, welches an einen cAMP/CRP-abhängigen Promotor bindet, der mit einem *lacZ*-Gen fusioniert ist. Die Funktionalität der Adenylatzyklase und somit die Interaktion zweier Proteine wird über die Aktivität der β -Galaktosidase bestimmt.

4.1.3 *In vivo* Interaktion von DctB mit der Sensorkinase DctS aus *B. subtilis*

Für mSPINE- und mHPINE-Interaktionsstudien wurde DctS-Strep mit DctB-His₆ coexprimiert. Die mSPINE-Untersuchungen wurden mit und ohne Zugabe von Formaldehyd durchgeführt. Nach Isolierung der Membranfraktion durch fraktionierte Zentrifugation und Solubilisierung der Membran mit 2% Empigen BB, erfolgte die Proteinreinigung mittels einer Strep-Tactin Affinitätssäule. Nach mehreren Waschschrritten wurden die gebundenen Proteine mit einem LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid)-haltigen Puffer isoliert. Das Eluat enthielt sowohl mit als auch ohne vorheriges Crosslinking DctS-Strep sowie DctB-His₆ (Abb. E5A). Dies weist auf eine starke Interaktion zwischen DctS und DctB hin. Zur Überprüfung einer möglichen unspezifischen Bindung von DctB-His₆ an die Strep-Tactin Säule wurde dieses in Abwesenheit von DctS-Strep exprimiert und isoliert. Es kam zu keiner Bindung von DctB-His₆ an die Strep-Tactin Säule, was eine unspezifische Bindung ausschließt (Abb. E5A). Aus dem Durchfluss des Eluats wurde mittels einer Ni²⁺-NTA-Säule DctB-His₆ isoliert, um die Expression des Proteins zu überprüfen (Abb. E5A).

Die mHPINE-Interaktionsstudien wurden ohne vorheriges Crosslinking durchgeführt. Die Membranisolierung und Proteinreinigung erfolgte analog zu den mSPINE-Experimenten. DctS-Strep konnte mittels einer Ni²⁺-NTA Affinitätssäule bei gleichzeitiger Anwesenheit von DctB-His₆ gereinigt werden (Abb. E5B). Dies bestätigt die Interaktion zwischen DctS und DctB. Wurde DctS-Strep in Abwesenheit von DctB-His₆ exprimiert, wurde im Eluat der Ni²⁺-NTA Säule kein DctS-Strep detektiert (Abb. E5B). Dies schließt eine unspezifische Bindung von DctS-Strep an die Ni²⁺-NTA Säule aus. Aus dem Durchfluss des Eluats wurde mittels einer Strep-Tactin Säule DctS-Strep isoliert, um die Expression des Proteins zu überprüfen. (Abb. E5B).

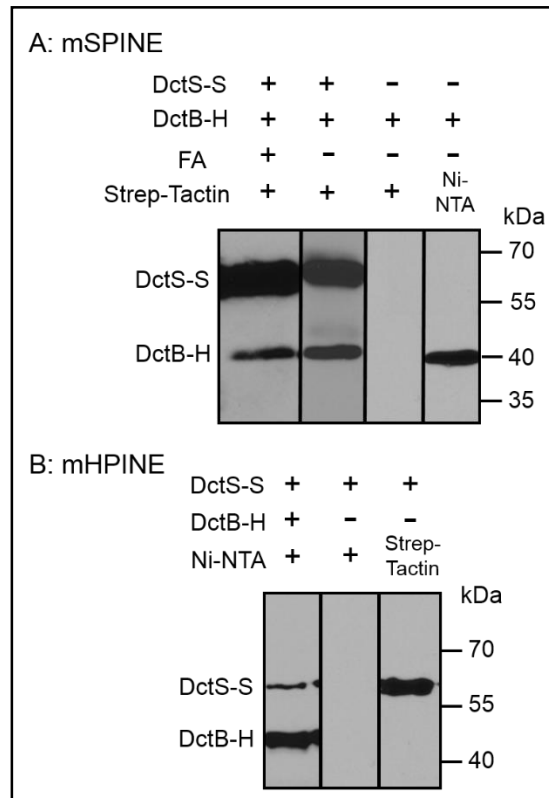


Abb. E5: *In vivo* Bindung von DctB-His (DctB-H) an DctS-Strep (DctS-S) und Co-Reinigung mittels Strep-Tactin (mSPINE, A) und Ni-NTA (mHPINE, B). DctS-S (pMW1788) und DctB-H (pMW1795) wurden in *E. coli* C43 coexprimiert. Für mSPINE Untersuchungen erfolgte bei einer OD_{578nm} von 1,3-1,6 die Zugabe von 0,6 % Formaldehyd. DctS-S wurde aus der mit 2% Empigen solubilisierten Membranfraktion mittels einer Strep-Tactin Säule isoliert. Für mHPINE Untersuchungen erfolgte keine Zugabe von Formaldehyd. DctB-H wurde aus der mit 2% Empigen solubilisierten Membranfraktion über eine Ni^{2+} -NTA-Säule isoliert. Der Elutionspuffer enthielt bei (A) und (B) 0,04% des Detergenz LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid). Der Nachweis der Proteine erfolgte über Chemilumineszenz mit Anti-Strep bzw. Anti-His Antikörpern. Die ersten drei Elutionsfraktionen wurden nach der Säulenreinigung aufkonzentriert. Es wurden pro Bahn 20 μ l der gereinigten Proteine aufgetragen.

Die Spezifität der mSPINE-Experimente wurde außerdem mit zwei nicht interagierenden Proteinpaaren überprüft (Abb. E6). Hierfür wurden DctS-Strep mit His₆-DctP aus *Aromatoleum aromaticum* (Abb. E6A) bzw. DctS-Strep mit His₆-PASc-T25 (Abb. E6B) coexprimiert. DctP aus *A. aromaticum* ist ein Bindeprotein, welches wie DctP aus *R. capsulatus* im Chromosom direkt benachbart zu *dctQM*-Genen lokalisiert ist (Fischer, 2012). Es ist vermutlich funktionell mit einem DctQM-Transporter assoziiert und sollte nicht mit einer Sensorkinase wie DctS interagieren. His₆-PASc-T25 ist ein Proteinkonstrukt bestehend aus der PASc-Domäne von DcuS aus *E. coli* fusioniert mit dem T25-Fragment der Adenylatzyklase sowie einem N-terminalen His₆-Anhang. Nach Coexpression von DctS-Strep mit His₆-DctP bzw. His₆-PASc-T25 konnte mittels Strep-Tactin Reinigung nur DctS-Strep, nicht aber His₆-DctP oder His₆-PASc-T25 im Eluat identifiziert werden (Abb. E6). Aus dem Durchfluss des Eluats wurde mittels einer Ni^{2+} -NTA Säule His₆-DctP bzw. His₆-PASc-T25 gereinigt, um die Expression der Proteine zu überprüfen (Abb. E6).

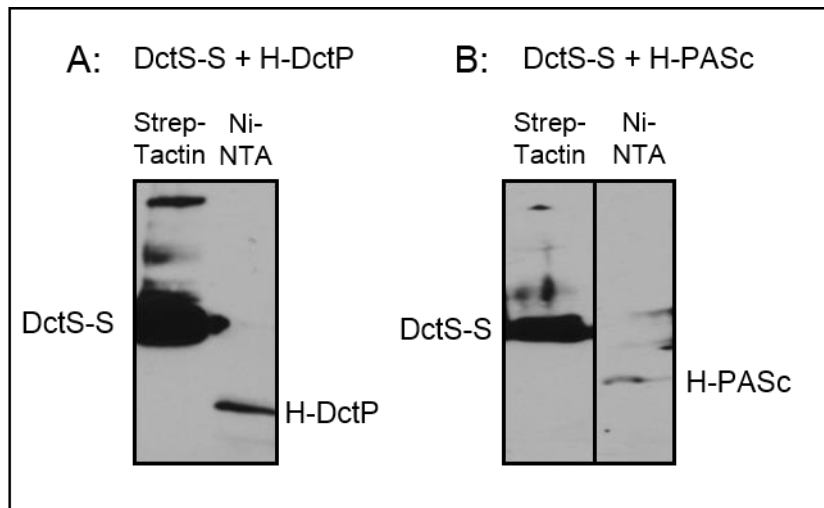


Abb. E6: **Kontrolle der Spezifität der mSPINE-Experimente mit zwei nicht-interagierenden Proteinpaaren.** (A) DctS-Strep (DctS-S; pMW1788) und His₆-DctP (H-DctP; pMW1800) aus *Aromatoleum aromaticum* wurden in *E. coli* C43 coexprimiert. Bei einer OD_{578nm} von 1,3-1,6 erfolgte die Zugabe von 0,6 % Formaldehyd. DctS-S wurde aus der mit 2% Empigen solubilisierten Membranfraktion mittels einer Strep-Tactin Säule gereinigt. (B) Coexpression und Crosslinking von DctS-Strep (DctS-S; pMW1788) und His₆-PASc-T25 (H-PASc; pMW1657). Der Elutionspuffer enthielt bei (A) und (B) 0,04% des Detergenz LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid). Der Nachweis der Proteine erfolgte über Chemilumineszenz mit Anti-Strep bzw. Anti-His Antikörpern. Die ersten drei Elutionsfraktionen wurden nach der Säulenreinigung aufkonzentriert. Es wurden pro Bahn 20 µl der gereinigten Proteine aufgetragen.

Als weitere unabhängige Methode zur Untersuchung der Interaktion zwischen DctB und DctS wurden BACTH-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden DctB und DctS jeweils mit dem T18- bzw. T25-Fragment N- oder C-terminal fusioniert. Die β -Galaktosidaseaktivität aller acht möglichen Interaktionskombinationen wurde im Vergleich zu dem interagierenden Sensor/Regulator Paar DctS/DctR gemessen (Abb. E7). Drei der acht möglichen Fusionskombinationen zeigten eine positive Interaktion. Somit bestätigen die BACTH-Messungen die Interaktion zwischen DctS und DctB. Bei der Kombination DctS-T18/T25-DctB war eine sehr starke Interaktion von 1316 MU messbar. Diese Aktivität entspricht etwa jener des Sensor/Regulator Paares DctS/DctR. (Abb. E7). Die Aktivität der anderen beiden positiven Interaktionskombinationen lag mit 349 MU (T18-DctS/T25-DctB) und 637 MU (T25-DctS/T18-DctB) 5-fach bzw. 9-fach über jener des nicht-interagierenden Paares T18-DctS/Zip-T25. Interessanterweise zeigen vor allem die DctS-Fusionsproteine eine negative Interaktion, welche mit einem am C-Terminus von DctB fusionierten T18- oder T25-Fragment kombiniert sind. Eine negative Interaktion mit C-terminal fusionierten DctB-Varianten klingt plausibel, da der C-Terminus des Proteins vermutlich extrazellulär vorliegt (Abb. E8). Einzige Ausnahme bildet die Kombination DctS-T25/T18-DctB, die trotz N-terminaler Fusion an DctB keine Interaktion zeigt.

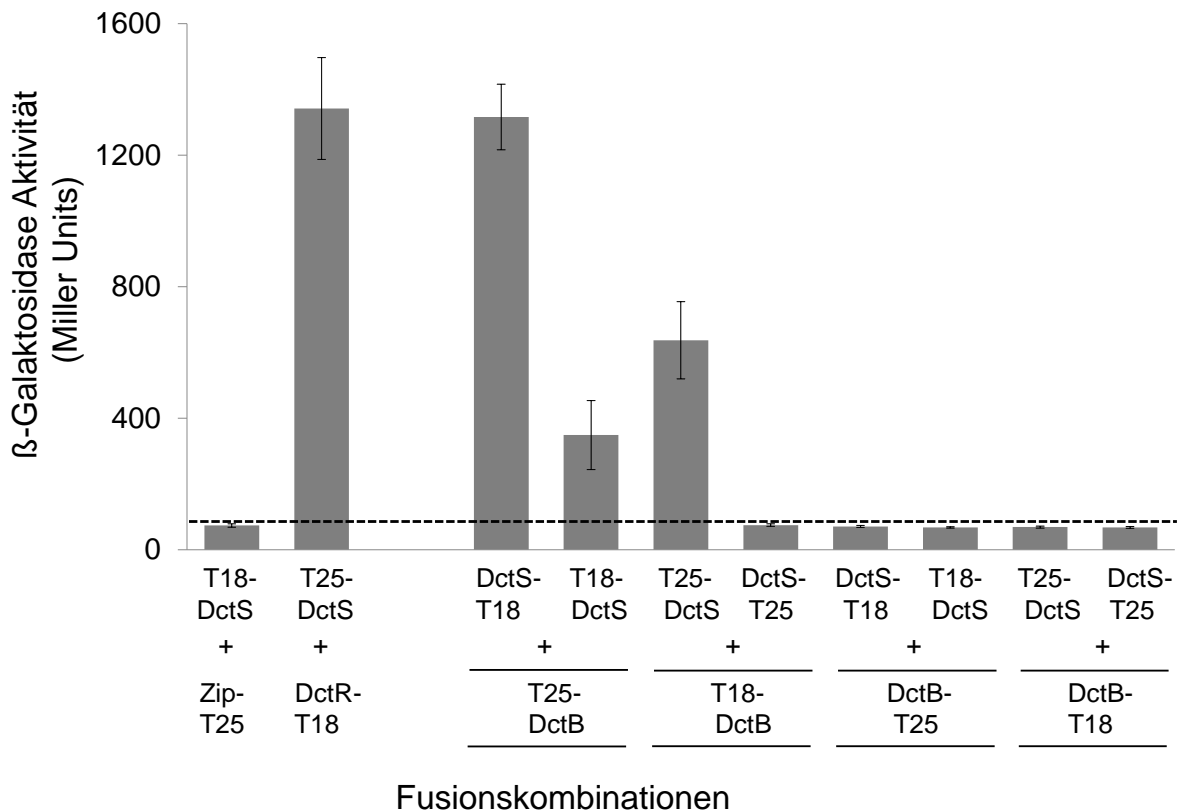


Abb. E7: **Interaktion von DctS mit DctB im Bacterial Two Hybrid System (BACTH).** *E. coli* BTH101 wurde mit je einem T25-Fusionsplasmid und einem T18-Fusionsplasmid co-transformiert. T25-Fusionen: T25-DctS (pMW1697), T25-DctB (pMW1705); T18-Fusionen: T18-DctS (pMW1696), DctS-T18 (pMW1695), DctR-T18 (pMW1699), T18-DctB (pMW1708). Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde nach Zucht der Zellen bis zu einer OD_{578nm} von 0,5-0,7 bestimmt. Als Kontrolle für ein interagierendes Sensor/Regulator Paar wurde die β-Galaktosidase-Aktivität von T25-DctS mit DctR-T18 gemessen. Als Kontrolle für nicht miteinander interagierende Proteine wurde die Aktivität von T18-DctS mit dem Leucin-Zipper Protein Zip-T25 bestimmt. Die Aktivität der nicht-interagierenden Proteine lag unterhalb von 80 Miller units (gestrichelte Linie).

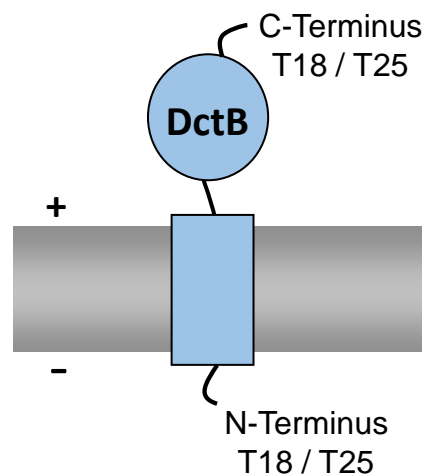


Abb. E8: **Vorhergesagte Topologie von DctB und Lage des T18- und T25-Fragmentes bei Fusion mit DctB.** DctB besitzt eine vorhergesagte Transmembranhelix nahe des N-Terminus. Somit liegt der C-Terminus des Proteins wahrscheinlich extrazellulär vor. Bei T18-/T25-Fusionskombinationen mit dem C-Terminus von DctB kann es bei BACTH-Messungen daher nicht zur Bildung einer funktionalen Adenylatzyklase kommen.

4.1.4 *In vivo* Interaktion von DctA mit der Sensorkinase DctS aus *B. subtilis*

Der C₄-Dicarboxylat Transporter DctA vermittelt in *B. subtilis* den protonengekoppelten Symport von Fumarat, Malat, Succinat und Oxalacetat in die Zelle (Groeneveld et al., 2010). DctA_{Bs} besitzt 53 %ige Sequenzidentität zu DctA aus *E. coli*. Zusätzlich zur Aufgabe als Transporter, besitzt DctA aus *E. coli* die Funktion eines Cosensors für DcuS (Witan et al., 2012a; 2012b). Experimentelle Hinweise legen eine Rolle von DctA aus *B. subtilis* als Cosensor für DctS nahe. Bei genetischer Inaktivierung von DctA erhöht sich ähnlich wie in *E. coli* die *dctA*-Expression etwa um das Vierfache (Asai et al., 2000). Eine mögliche Interaktion zwischen DctS und DctA wurde *in vivo* mittels mSPINE und mHPINE untersucht. Hierfür wurde DctS-Strep mit DctA-His₆ in *E. coli* coexprimiert. mSPINE-Untersuchungen zeigen die Bindung von DctA-His₆ an eine Strep-Tactin Säule bei gleichzeitiger Anwesenheit von DctS-Strep (Abb. E9A).

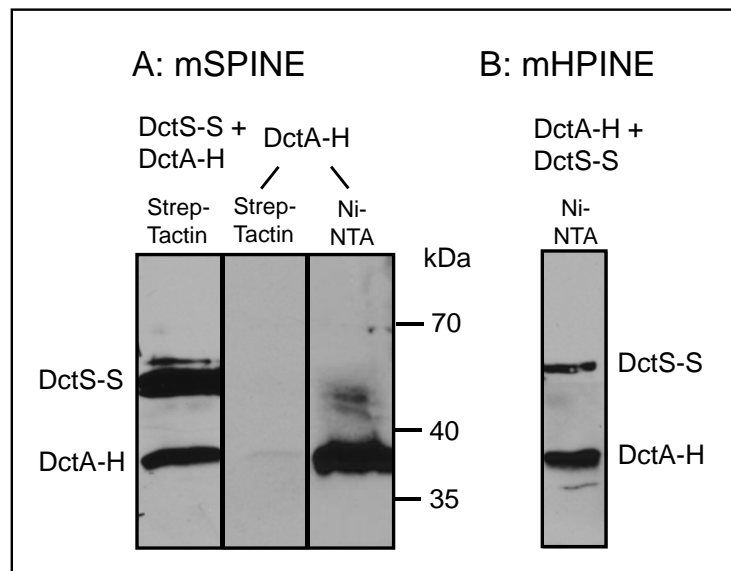


Abb. E9: **Interaktion von DctA mit DctS in mSPINE- (A) und mHPINE- (B) Untersuchungen.** DctS-S (pMW1788) und DctA-H (pMW1797) wurden in *E. coli* C43 coexprimiert. Für mSPINE-Untersuchungen wurde DctS-S aus der mit 2% Empigen solubilisierten Membranfraktion mittels einer Strep-Tactin Säule isoliert. In mHPINE Untersuchungen wurde DctB-H aus der mit 2% Empigen solubilisierten Membranfraktion über eine Ni²⁺-NTA Säule gereinigt. Für Interaktionsstudien mit DctA wurde kein Formaldehyd verwendet. Ein Entfernen des Crosslinks durch Aufkochen war für Proben mit DctA nicht möglich, da DctA unter diesen Umständen Aggregate bildet. Der Elutionspuffer enthielt bei (A) und (B) 0,04% des Detergenz LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid). Der Nachweis der Proteine erfolgte über Chemilumineszenz mit Anti-Strep bzw. Anti-His Antikörpern. Die ersten drei Elutionsfraktionen wurden nach der Säulenreinigung aufkonzentriert. Es wurden pro Bahn 20 µl der gereinigten Proteine aufgetragen.

Wird DctA-His₆ in Abwesenheit von DctS-Strep exprimiert, erfolgt nur eine kaum nachweisbare Bindung von DctA an die Strep-Tactin Säule. Somit kann eine unspezifische Bindung von DctA-His₆ an die Strep-Tactin Säule im Wesentlichen ausgeschlossen werden. mHPINE Untersuchungen zeigen im Ni²⁺-NTA Säuleneluat bei Anwesenheit von DctA-His₆ eine Co-

Elution von DctS-Strep. Dieses bindet nicht unspezifisch an die Ni²⁺-NTA Affinitätssäule (Abschnitt 4.1.3, Abb. E5). Die mSPINE- und mHPINE-Interaktionsstudien mit DctS und DctA wurden ohne Formaldehyd-Crosslinking durchgeführt. Zur Größenauftrennung der durch Formaldehyd miteinander vernetzten Proteine muss die kovalente Bindung zwischen den Proteinen und dem Formaldehydmolekül aufgehoben werden. Dies wird durch 20 minütiges Aufkochen der Proben bei 95 °C bewerkstelligt. Kocht man Proteinproben mit DctA auf, kommt es zur Aggregatbildung des Transporters und das Protein kann im Folgenden nicht mehr seiner Größe entsprechend aufgetrennt werden. Die DctS/DctA-Interaktionsstudien zeigen bereits ohne vorheriges Crosslinking eine starke Interaktion zwischen der Sensorkinase und dem Transporter.

Die Interaktion zwischen DctS und DctA wurde zusätzlich mittels BACTH-Messungen untersucht. Hierfür wurden DctS und DctA jeweils mit dem T18- bzw. T25-Fragment N- oder C-terminal fusioniert. Die β -Galaktosidaseaktivität aller acht möglichen Interaktionskombinationen wurde im Vergleich zu dem interagierenden Sensor/Regulator Paar T25-DctS/DctR-T18 gemessen (Abb. E10).

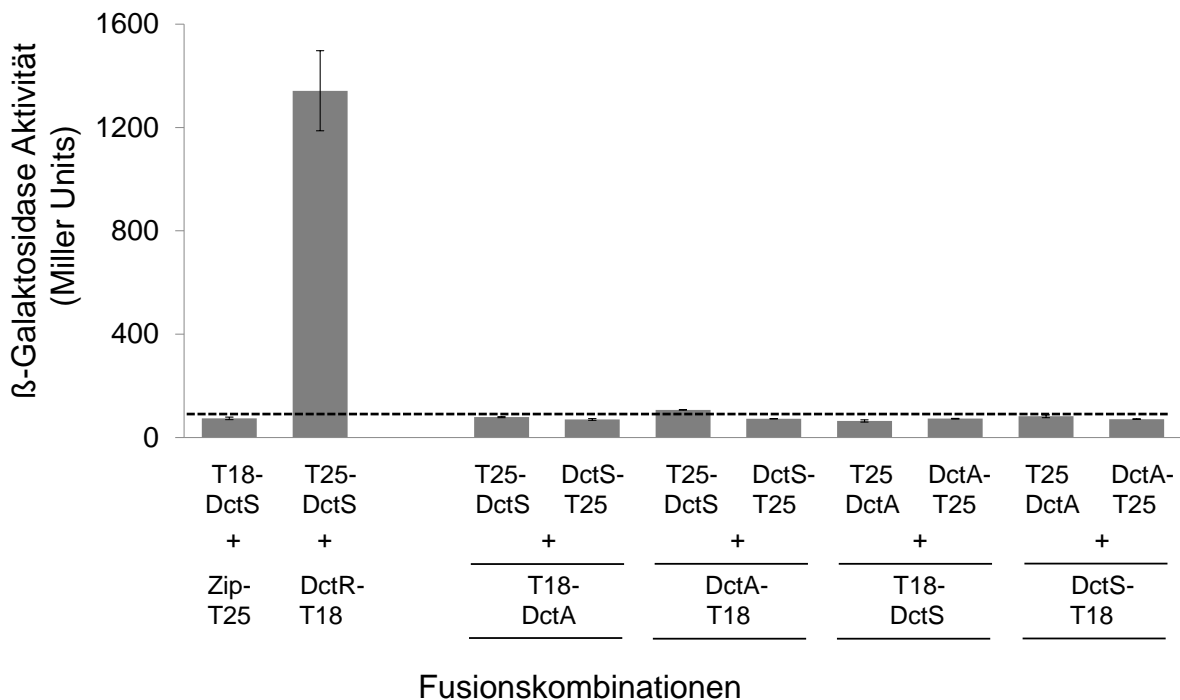


Abb. E10: **Interaktionsstudien zwischen DctS und DctA im Bacterial Two Hybrid System (BACTH).** *E. coli* BTH101 wurde mit je einem T25-Fusionsplasmid und einem T18-Fusionsplasmid co-transformiert. T25-Fusionen: T25-DctS (pMW1697), DctS-T25 (pMW1694); T18-Fusionen: DctR-T18, (pMW1699), T18-DctS (pMW1696), DctS-T18 (pMW1695), T18-DctA (pMW1704), DctA-T18 (pMW1703). Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde nach Zucht der Zellen bis zu einer OD_{578nm} von 0,5-0,7 bestimmt. Als Kontrolle für ein interagierendes Sensor/Regulator Paar wurde die β -Galaktosidase-Aktivität von T25-DctS mit DctR-T18 gemessen. Als Kontrolle für nicht miteinander interagierende Proteine wurde die Aktivität von T18-DctS mit dem Leucin-Zipper Protein Zip-T25 bestimmt. Die Aktivität der nicht-interagierenden Proteine lag unterhalb von 80 Miller units (gestrichelte Linie).

Keine der acht Fusionskombinationen zeigte eine positive Interaktion zwischen DctS und DctA. Die β -Galaktosidaseaktivität der Kombinationen lag hauptsächlich etwa bei dem gleichen Wert wie jene des nicht-interagierenden Paares T18-DctS/Zip-T25 (Abb. E10). Einzige Ausnahme bildete das Fusionspaar T25-DctS/DctA-T18, welches eine geringfügig höhere Aktivität von 107 MU zeigte. In BACTH-Messungen kann es auf Grund von sterischen Hindernissen zu falsch negativen Ergebnissen kommen (Kleefeld et al., 2009). Dies wird für die BACTH-Messungen zwischen DctS und DctA vermutet. Da DctA ein Membranprotein mit 8-10 vorhergesagten Transmembranhelices ist, sind sterische Komplikationen bei *in vivo* Interaktionsstudien möglich. Die Topologie von DctA aus *B. subtilis* wurde bisher nicht bestimmt. Die Topologie von DctA aus *E. coli* wurde über die Zugänglichkeit der periplasmatisch aktiven alkalischen Phosphatase PhoA und der cytoplasmatisch aktiven β -Galaktosidase LacZ bestimmt (Witan et al., 2012a). Demnach besteht DctA_{Ec} aus 8 Transmembranhelices, wobei der C- sowie der N-Terminus des Proteins auf der Cytoplasmaseite liegen. Die Lage des N- und C-Terminus im Cytoplasma macht Interaktionsstudien mit DctA_{Ec} über BACTH-Messungen prinzipiell möglich. Ein Protein, bei welchem beide Termini auf der Periplasmaseite lokalisiert sind, ist nicht geeignet für BACTH-Interaktionsstudien, da die Adenylatzyklase nur im Cytoplasma aktiv ist. Topologievorhersagen für DctA_{Bs} zeigen, dass dieses 8-10 vorhergesagte Transmembranhelices besitzt und der N- bzw. C-Terminus des Proteins wahrscheinlich cytoplasmatisch vorliegt. Liegen die Termini jedoch auf der Periplasmaseite, wäre dies eine weitere Erklärung für die negativen Interaktionsmessungen.

4.1.5 Interaktionsstudien zwischen DctB und DctA

Das zu DctB homologe DctP-Bindeprotein aus *R. capsulatus* ist eine essentielle Komponente des hochaffinen DctPQM TRAP-Transporters zur Aufnahme von C₄-Dicarbonsäuren (Shaw et al., 1991; Walmsley et al., 1992a; 1992b; Forward et al., 1997). Vermutlich interagiert DctP mit den Membrankomponenten DctQ und DctM, um diesen C₄-Dicarboxylate zuzuführen (Kelly und Thomas, 2001; Mulligan et al., 2011). Das Bindeprotein DctB zeigt Interaktion mit der Sensorkinase DctS und agiert als Cosensor für DctS (vgl. 4.1.3). Zur Untersuchung einer zusätzlichen Rolle von DctB als Bindeprotein für den C₄-Dicarboxylat Transporter DctA wurde eine mögliche Interaktion von DctB mit DctA getestet. Des Weiteren wurde der Einfluss von DctB auf den DctA-vermittelten Transport von [¹⁴C]-Succinat in *B. subtilis* untersucht.

Einfluss von DctB auf den DctA-vermittelten Transport von [¹⁴C]-Succinat

Zur Untersuchung der Rolle von DctB für die Succinataufnahme wurde der Transport von [¹⁴C]-Succinat in *B. subtilis* mit wildtypischem DctB im Vergleich zu einer DctB-Insertionsmutanten gemessen (Abb. E11A). Die Aufnahme von Succinat in *B. subtilis* ist abhängig von DctA (Groeneveld et al., 2010). *B. subtilis* 168, welcher wildtypisches DctB und DctA besitzt, zeigt eine effiziente Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat (Abb. E11A).

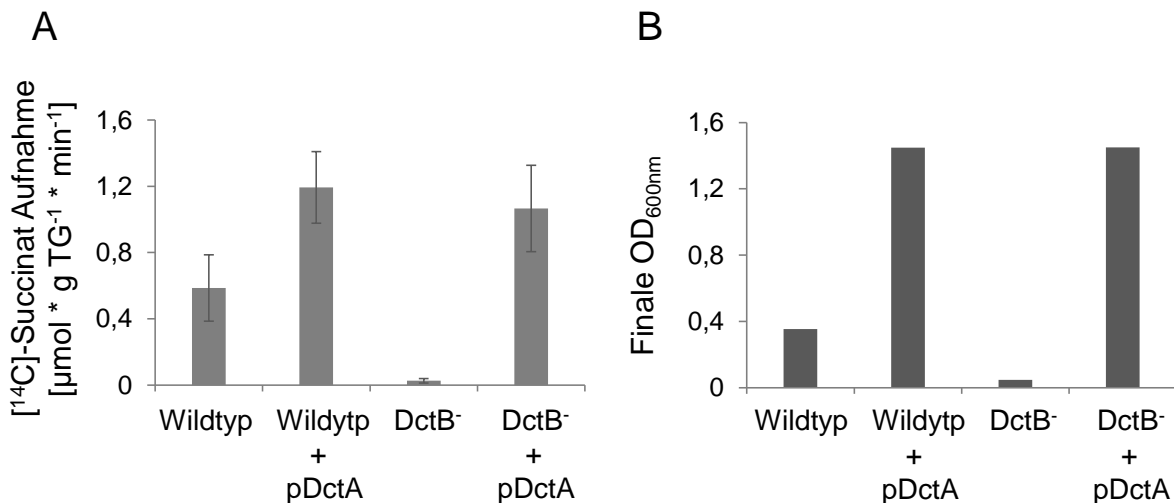


Abb. E11: **Einfluss von DctA und DctB auf die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat (A) und das Wachstum auf Succinat (B) in *B. subtilis*.** Getestet wurden der *B. subtilis* 168 Wildtypstamm, eine DctB-Insertionsmutante (DctB⁻) sowie beide Stämme mit plasmidkodiertem, konstitutiv exprimiertem DctA (pDctA). Die Expression von plasmidkodiertem DctA erfolgte von dem Vektor pBQ200 (pMW1927). (A) Die Zellen wurden aerob bei 37 °C in White-Medium (White, 1972) mit 0,05 % Hefeextrakt und 20 mM Succinat als C-Quelle gezüchtet. Für Transportmessungen wurde eine Bakterienuspension mit einer OD_{600nm} ~ 8 mit 20 μM [¹⁴C]-Succinat inkubiert. Die Standardabweichung errechnete sich aus mindestens 3 unabhängigen Zuchten in zwei Parallelen. Abkürzungen: TG = Trockengewicht der Bakterienzellen; OD = optische Dichte der Bakterienuspension. (B) Die Zellzucht erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37 °C in White-Medium (White, 1972) mit 0,01 % Hefeextrakt und 20 mM Succinat als C-Quelle. Die Wachstumstests wurden mit je einer Zucht durchgeführt. (Abb. verändert nach Schmieden, 2013)

Für die Expression des DctA-Transporters in *B. subtilis* wird zusätzlich zu DctSR das Bindeprotein DctB benötigt. Daher wird im DctB-negativen Hintergrund DctA nicht mehr exprimiert, was zu einem Verlust der Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat führt (Abb. E11A). Die Expression von DctA von dem Vektor pBQ200, welcher einen von DctSR unabhängigen Promotor besitzt, komplementiert die Succinataufnahme in *B. subtilis*. Die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat im DctB-negativen Hintergrund mit plasmidkodiertem DctA übersteigt sogar die wildtypische Succinataufnahme. Auch im DctB-positiven Hintergrund ist die Succinataufnahme mit plasmidkodiertem DctA erhöht. Dies liegt vermutlich an der stärkeren Expression von DctA in dem Vektor pBQ200. Dieser ist ein Vektor mit einer hohen Kopienzahl und besitzt zur Expression von DctA den konstitutiven starken Promotor *degQ*ⁿ.

Der Einfluss von DctA und DctB auf die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in *B. subtilis* zeigt eine starke Korrelation zum Succinat-abhängigen Wachstum der entsprechenden *B. subtilis* Stämme (Abb. E11B). Die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat sowie das Wachstum auf Succinat sind somit in *B. subtilis* unabhängig von DctB. DctB agiert daher nicht als Bindeprotein für den Transporter DctA.

Protein-Protein Interaktionsstudien zwischen DctB und DctA: mSPINE und BACTH

Wenn DctB nicht als Bindeprotein für DctA agiert, besteht keine Notwendigkeit zur physikalischen Interaktion zwischen den beiden Proteinen. Ob eine Interaktion zwischen DctA und DctB besteht, wurde mittels mSPINE-Tests überprüft. Hierfür wurden DctA-Strep und DctB-His₆ coexprimiert und DctA-Strep wurde aus der Membranfraktion mittels Strep-Tactin Affinitätschromatographie gereinigt. Es erfolgte kein Formaldehyd-Crosslinking, da DctA-Proben auf Grund der Aggregation des Proteins nicht aufgekocht werden können. Die Elutionsfraktion wurde mittels eines Western-Immunoblots analysiert (Abb. E12A). DctB-His₆ konnte bei Anwesenheit von DctA-Strep nicht über eine Strep-Tactin Säule isoliert werden. Aus dem Durchfluss der Strep-Tactin Säulenreinigung konnte DctB-His₆ über eine Ni²⁺-NTA Affinitätssäule gereinigt werden (Abb. E12A). DctB-His₆ war demnach in der Membranfraktion enthalten, zeigte jedoch keine Interaktion mit DctA-Strep.

Interaktionsstudien mit DctA und DctB wurden zusätzlich mittels BACTH-Messungen durchgeführt. Hierfür wurde die β -Galaktosidaseaktivität aller acht möglichen T18- und T25-Fusionskombinationen von DctA und DctB gemessen und mit der Aktivität des interagierenden Sensor/Regulator-Paares T25-DctS/DctR-T18 bzw. des nicht-interagierenden T18-DctS/Zip-T25-Paares verglichen. Keine der acht Interaktionskombinationen zeigte eine Aktivität, welche einen höheren Wert als jene des nicht-interagierenden Proteinpaares besaß. In Abb. E12B ist beispielhaft die Aktivität des Proteinpaares T18-DctA/T25-DctB gezeigt. Die BACTH-Messungen bestätigen somit die fehlende Interaktion des Bindeproteins DctB mit dem Transporter DctA. Da die Lage des N- und C-Terminus von DctA aus *B. subtilis* bisher noch unbekannt ist, könnten BACTH-Messungen mit DctA wie bereits in Abschnitt 4.1.4 besprochen problematisch sein und es könnte zu falsch negativen Ergebnissen kommen. Da mSPINE-Untersuchungen jedoch auch keine Interaktion zwischen DctA und DctB zeigten, ist davon auszugehen, dass die beiden Proteine tatsächlich nicht miteinander interagieren. Die fehlende Interaktion zwischen DctB und DctA ist in Übereinstimmung mit den Messungen des DctA-vermittelten Transports von [¹⁴C]-Succinat, welcher unabhängig von DctB ist. Dies schließt eine Beteiligung von DctB am Transport von C₄-Dicarbonsäuren und somit die Notwendigkeit der Interaktion von DctB mit DctA aus.

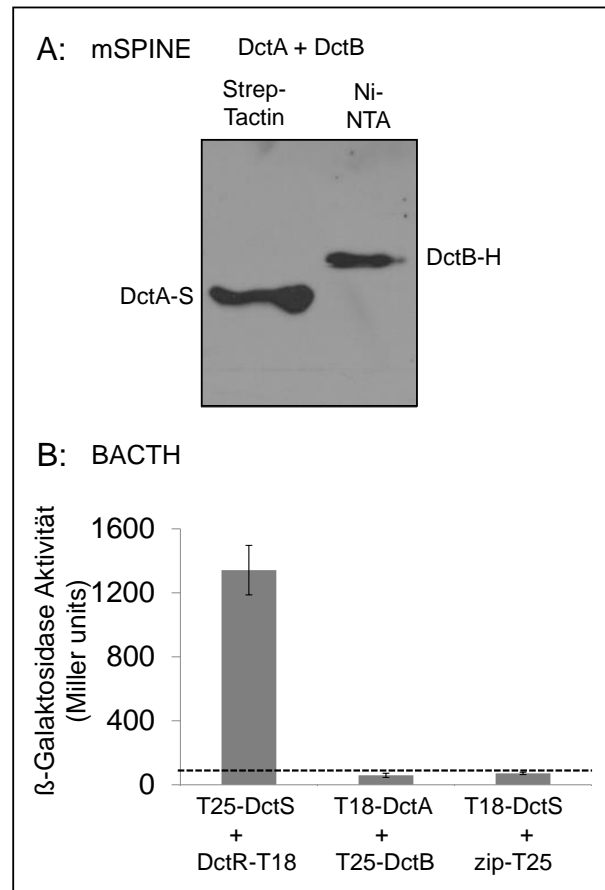


Abb. E12: **Interaktionsstudien zwischen DctA und DctB in mSPINE- (A) und BACTH- (B) Untersuchungen.** (A) DctA-Strep (DctA-S) und DctB-His₆ (DctB-H) wurden in *E. coli* C43 coexprimiert und die Membranfraktion durch Zugabe von 2% Empigen BB solubilisiert. DctA-S wurde mittels einer Strep-Tactin Säule gereinigt. Der Elutionspuffer enthielt 0,04% des Detergenz LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid). Der Nachweis der Proteine erfolgte über Chemilumineszenz mit Anti-Strep bzw. Anti-His Antikörpern. Die ersten drei Elutionsfraktionen wurden nach der Säulenreinigung aufkonzentriert. Es wurden pro Bahn 20 μ l der gereinigten Proteine aufgetragen. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde der Prestained Protein Marker #26616 von Fermentas verwendet. (B) *E. coli* BTH101 wurde mit je einem T25-Fusionsplasmid und einem T18-Fusionsplasmid co-transformiert. T25-Fusionen: T25-DctS (pMW1697), T25-DctB (pMW1705); T18-Fusionen: T18-DctS (pMW1696), DctR-T18 (pMW1699), T18-DctA (pMW1704). Die β -Galaktosidase Aktivität wurde nach Zucht der Zellen bis zu einer OD_{578nm} von 0,5-0,7 bestimmt. Als Kontrolle für ein interagierendes Sensor-Regulator Paar wurde die β -Galaktosidase Aktivität von T25-DctS mit DctR-T18 gemessen. Als Kontrolle für nicht miteinander interagierende Proteine wurde die Aktivität von T18-DctS mit dem Leucin-Zipper Protein Zip-T25 bestimmt. Die Aktivität der nicht-interagierenden Proteine lag unterhalb von 80 Miller units (gestrichelte Linie).

4.1.6 Bildung einer DctS/DctA/DctB-Sensoreinheit

Die Sensorkinase DctS aus *B. subtilis* zeigt Interaktion sowohl mit dem C₄-Dicarboxylat-Transporter DctA als auch mit dem Bindeprotein DctB (Abb. E13). Transporter und Bindeprotein zeigen keine Interaktion und der DctA-vermittelte Transport von [¹⁴C]-Succinat ist unabhängig von DctB. Zusammen mit genetischen Mutationsanalysen (Asai et al., 2000) legen diese Ergebnisse eine Cosensor-Funktion von DctA und DctB nahe.

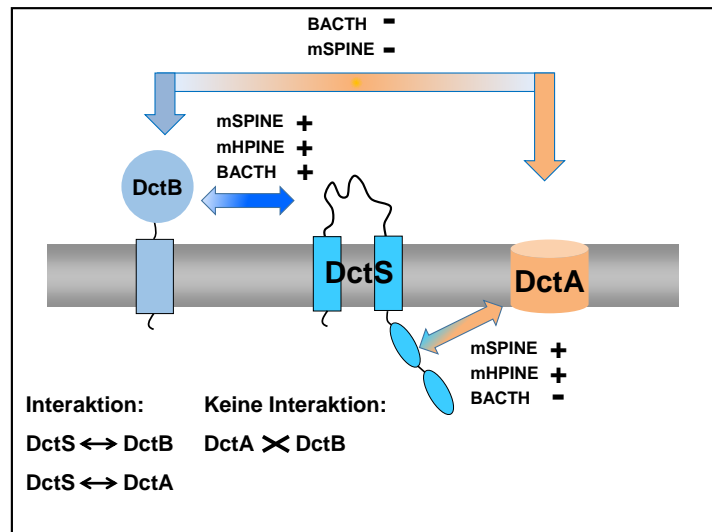


Abb. E13: **Interaktion von DctB und DctA mit DctS: Nachweis mit verschiedenen Methoden (Zusammenfassung).** Die direkte Interaktion zwischen DctS und DctB wurde über mSPINE, mHPINE und BACTH gezeigt. mSPINE und mHPINE Studien zeigen außerdem eine Interaktion von DctA mit DctS.

Zur Untersuchung einer möglichen Bildung eines DctS/DctA/DctB-Komplexes, wurde die gleichzeitige Bindung von DctA und DctB an DctS getestet. In einem mSPINE-Test wurden DctS-Strep, DctA-His₆ und DctB-His₆ coexprimiert. DctA-His₆ und DctB-His₆ wurden hierfür auf einem Plasmid gemeinsam exprimiert, in welchem die Expression jedes einzelnen Proteins durch Arabinose induzierbar war. Nach Isolierung und Solubilisierung der Membranfraktion mit 2% Empigen BB wurde diese zur Proteinreinigung auf eine Strep-Tactin Affinitätssäule gegeben. Nach mehreren Waschschrritten wurden die Proteine mit einem Puffer, welcher als Detergenz LDAO enthielt, eluiert. Die Elutionsfraktion wurde in einem Western-Blot analysiert. Diese enthielt DctS-Strep und zusätzlich DctA-His₆ und DctB-His₆ (Abb. E14). DctA und DctB wurden mittels Antikörper gegen den His₆-Anhang, DctS mittels Strep-Antikörper identifiziert. Es erfolgte kein Formaldehyd-Crosslinking, da DctA-Proben nicht aufgeköcht werden können ohne zu aggregieren und somit die Vernetzung durch Formaldehyd nicht mehr aufgehoben werden kann. Die DctS-Strep vermittelte Bindung von DctA-His₆ und DctB-His₆ an eine Strep-Tactin Säule weist auf die Bildung einer sensorischen DctS/DctA/DctB-Einheit hin. Diese besteht entweder aus einem heterotrimeren Komplex der drei Proteine oder aus zwei gleichzeitig vorhandenen dimeren Komplexen DctS/DctA und DctS/DctB.

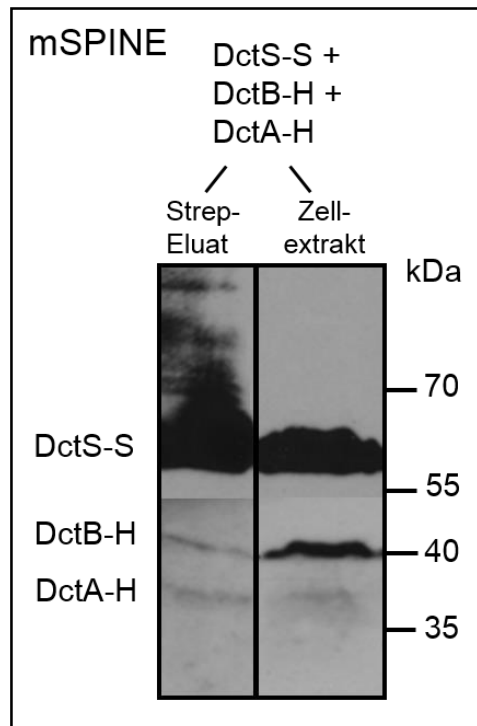


Abb. E14: **Bindung von DctA-His₆ (DctA-H) und DctB-His₆ (DctB-H) an DctS-Strep (DctS-S) und Co-Reinigung mittels mSPINE.** DctA-H und DctB-H wurden in pMW1975 exprimiert, die Expression wurde jeweils durch Arabinose induziert. Die Expression von DctS-S erfolgte in pMW1788. Die Proteine wurden in *E. coli* C43 coexprimiert und DctS-S mittels einer Strep-Tactin Säule gereinigt. Der Elutionspuffer enthielt 0,04% des Detergenz LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid). Der Nachweis der Proteine erfolgte über Chemilumineszenz mit Anti-Strep bzw. Anti-His Antikörpern. Die ersten drei Elutionsfraktionen wurden nach der Säulenreinigung aufkonzentriert. Es wurden pro Bahn 20 µl der gereinigten Proteine aufgetragen.

4.2 Charakterisierung der Sensorkinase DctS aus *Geobacillus kaustophilus*

Die Gattung *Geobacillus* gehört zur Familie der *Bacillaceae* und umfasst 11 Spezies. Dies sind thermophile Bakterien, deren optimale Wachstumstemperatur bei 55 °C bis 65 °C liegt (Nazina et al., 2001). *Geobacillus kaustophilus* verfügt über eine Sensorkinase, welche Homologie zu DctS aus *B. subtilis* (DctS_{Bs}) und DcuS aus *E. coli* (DcuS_{Ec}) besitzt. Diese besitzt 53 % bzw. 33 % Sequenzidentität zu DctS_{Bs} bzw. zu DcuS_{Ec}. Auf Grund der höheren Identität zu DctS aus *B. subtilis* wird die Sensorkinase aus *G. kaustophilus* im Folgenden als DctS_{Gk} bezeichnet.

In *E. coli* bildet die Histidinkinase DcuS zusammen mit dem Responseregulator DcuR ein Zweikomponentensystem zur Erkennung von C₄-Dicarbonsäuren und zur nachfolgenden Induktion der Gene der Fumaratatmung (*dcuB*, *fumB*, *frdABCD*) unter Anaerobiose. Unter aeroben Bedingungen spielt das Zweikomponentensystem bei alleiniger Anwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren eine wichtige Rolle zur Induktion des aeroben C₄-Dicarboxylat-Carriers DctA (Zientz et al., 1998; Golby et al., 1999).

DcuS_{Ec} sowie DctS aus *B. subtilis* und *G. kaustophilus* gehören zur CitA-Familie von Sensorhistidinkinasen. Diese zeichnen sich durch einen ähnlichen topologischen Aufbau aus (Abb. E15). Die Proteine bestehen aus zwei Transmembranhelices und einer dazwischenliegenden periplasmatischen Sensordomäne des PAS (Per-Arrnt-Sim)-Typs. Im Cytoplasma befinden sich zwei weitere Domänen, die als cytoplasmatische PAS_C- und Kinasedomäne bezeichnet werden.

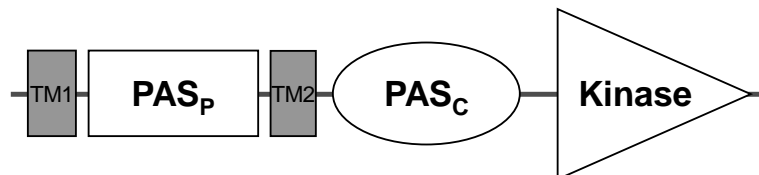


Abb. E15: **Schematische Darstellung der Domänenorganisation von Sensorhistidinkinasen der CitA-Familie.** TM, Transmembranhelix, PAS_p, periplasmatische PAS (Per-Arrnt-Sim)-Domäne, PAS_c, cytoplasmatische PAS (Per-Arrnt-Sim)-Domäne, Kinase, Kinasedomäne.

Der Mechanismus der Signaltransduktion von Sensorhistidinkinasen der CitA-Familie ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Vermutlich wird das Signal über eine Verschiebung der Transmembranhelix 2 in das Zellinnere weitergeleitet (Sevana et al., 2008). Die cytoplasmatische PAS_C-Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der Signalintegration und Weiterleitung des Signals zur Kinasedomäne (Witan et al., 2012a). Die Sensordomänen von DcuS und dem Citratsensor CitA wurden mit unterschiedlichen Methoden in ihrer Struktur gelöst. So konnte die Struktur der periplasmatischen PAS-Domäne von DcuS ohne gebundenen Effektor mithilfe der NMR-Spektroskopie sowie mit dem Effektor Malat mittels Röntgenstrukturanalysen bestimmt werden (Pappalardo et al., 2003; Cheung und Hendrickson, 2008). Die Struktur der periplasmatischen Domäne von CitA aus *K. pneumoniae* und die Interaktion mit dem Effektor wurde mittels Röntgenkristallographie ermittelt (Reinelt et al., 2003; Sevana et al., 2008). Des Weiteren wurde die Struktur des um die Kinasedomäne verkürzten DcuS-Konstruktes mittels Festkörper-NMR gelöst und aus den bisher vorhandenen Daten ein Modell zur Struktur von DcuS ermittelt (Etzkorn et al., 2008).

Die Schwierigkeiten bei der Aufklärung der Struktur von Membranproteinen wie DcuS und CitA liegen vor allem in der Flexibilität der Proteine während der Strukturanalyse. Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Struktur eines Membranproteins besteht in der Strukturanalyse homologer Proteine aus thermophilen Bakterien.

DctS aus dem thermophilen Bakterium *G. kaustophilus* kann in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden (Graf, 2009; vgl. 4.2.6). *G. kaustophilus* besitzt die Fähigkeit zum aeroben Wachstum auf den C₄-Dicarbonsäuren Fumarat, Succinat, Malat und Aspartat (Graf, 2009). Wie auch *B. subtilis* ist *G. kaustophilus* nicht befähigt zur anaeroben Fumaratatmung. Eine

Proteindatenbank-Recherche zum Vergleich der Gene des C₄-Dicarbonsäurestoffwechsels ergab, dass *B. subtilis* und *G. kaustophilus* die Genausstattung für die aerobe, nicht aber für die anaerobe Verwertung der C₄-Dicarboxylate besitzen (Abb. E16; Tab. E1). *E. coli* hingegen ist im Besitz der Gene für die aerobe sowie die anaerobe Verwertung von C₄-Dicarbonsäuren. Dieses verfügt über die Strukturgene *frdABCD*, welche für eine Fumaratreduktase kodieren. Diese katalysiert unter anaeroben Bedingungen die Reduktion von Fumarat zu Succinat. *frdABCD* liegt im Genom von *E. coli* stromaufwärts von *dcuSR* zwischen 94,34 min und 94,37 min. Die Expression der Fumaratreduktase wird von DcuSR induziert (Zientz et al., 1998). Unter aeroben Bedingungen werden C₄-Dicarbonsäuren im Citratzyklus verstoffwechselt. Die Succinatdehydrogenase SdhABCD katalysiert in *E. coli* die Oxidation von Succinat zu Fumarat. *B. subtilis* verfügt ebenso über eine Succinatdehydrogenase. Diese besteht jedoch nur aus den drei Untereinheiten SdhABC (Lancaster und Kröger, 2000). Die Proteindatenbank-Recherche ergab, dass *G. kaustophilus* eine Succinatdehydrogenase vom SdhABC-Typ wie *B. subtilis* besitzt. Die katalytische Untereinheit SdhA zeigt 84 %ige Sequenzidentität zu SdhA aus *B. subtilis* (Tab. E1).

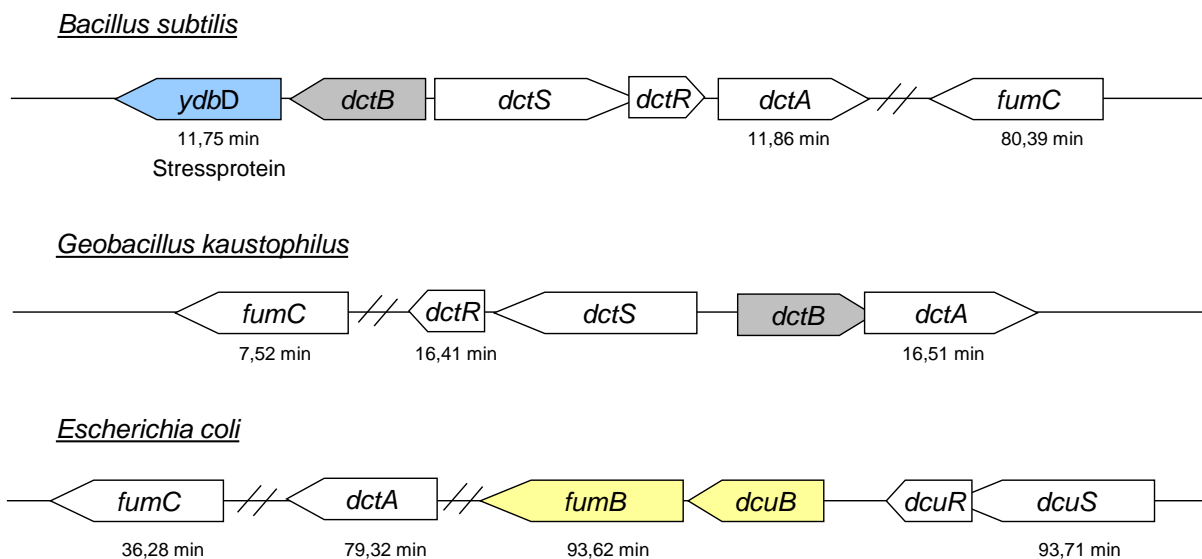


Abb. E16: **Organisation der Gene des C₄-Dicarbonsäurestoffwechsels von *G. kaustophilus* im Vergleich zu *B. subtilis* und *E. coli*.** Weiß bzw. grau hinterlegte Gene zeigen auf Proteinebene Homologien zueinander. Blau bzw. gelb hinterlegte Gene sind ausschließlich Bestandteil des *B. subtilis* bzw. des *E. coli* Genoms. Die Lage der Gene ist unterhalb des jeweiligen Gens in min angegeben.

B. subtilis und *G. kaustophilus* besitzen außerdem keine anaerob exprimierte Fumarase. Fumarasen katalysieren die reversible Hydratisierung von Fumarat zu Malat. Sowohl in *B. subtilis* als auch in *G. kaustophilus* wurde eine Fumarase des C-Typs identifiziert. Fumarasen des C-Typs werden unter aeroben Bedingungen exprimiert (Tseng et al., 2001). *E. coli* verfügt neben der Fumarase C noch über die Fumarase B, welche anaerob exprimiert wird (Tab. E1).

Tab. E1: **Vergleich der Proteine des C₄-Dicarbonsäurestoffwechsels zwischen *B. subtilis*, *E. coli* und *G. kaustophilus*.** Das Vorhandensein eines Proteins in dem jeweiligen Bakterium ist durch + oder der Sequenzidentität zu einem homologen Protein angegeben. Nicht vorhandene Proteine sind mit - gekennzeichnet.

		<i>E. coli</i>	<i>G. kaustophilus</i>
	<i>B. subtilis</i>	Identität zu <i>Bs</i> [%]	Identität zu <i>Bs / Ec</i> [%]
Sensorische HisK			
DcuS-Typ	+	30	53 / 33
Response-Regulator			
DcuR-Typ	+	33	55 / 33
Aerober C₄-Carrier			
DctA-Typ	+	53	52 / 47
DauA-Typ	+	37	-
Anaerobe C₄-Carrier			
DcuA/B-Familie	-	+	-
DcuC-Familie	-	+	-
Bindeprotein			
DctB-Typ	+	26 ^{*a}	46 / 24
Succinatdehydrogenase	+	31 ^{*b}	84 ^{*b} / 32 ^{*b}
Fumaratreduktase	-	+	-
Fumarasen			
Fumarase A/B-Typ	-	+	-
Fumarase C-Typ	+	63	66 / 56
Aspartase			
AspA-Typ	+	47	-

*a: Das Bindeprotein aus *E. coli* (*YiaO*) spielt keine Rolle im C₄-Dicarbonsäurestoffwechsel.

*b: Die Identitäten beziehen sich auf Sequenzalignments zwischen den katalytischen Untereinheiten der Succinatdehydrogenase (*SdhA*).

Sowohl in *E. coli* als auch in *B. subtilis* und *G. kaustophilus* sind die Gene für ein DcuSR- bzw. DctSR-Zweikomponentensystem direkt benachbart im Chromosom lokalisiert, welche in *E. coli* und *B. subtilis* kotranskribiert werden (Abb. E16). In *G. kaustophilus* weist die Anordnung der Gene ebenso auf eine Kotranskription von *dctSR* hin. *G. kaustophilus* besitzt ein Gen, welches für einen Transporter homolog zu dem aeroben Transporter DctA_{Bs/Ec} kodiert. Die Sequenzidentität zu DctA_{Bs} beträgt 52 %, während der Transporter zu DctA_{Ec} eine Identität von

47 % aufweist. Ein kürzlich identifizierter weiterer aerober C₄-Dicarboxylat Carrier in *E. coli* ist der DauA-Transporter (Karinou et al., 2013). Dieser ist der Haupt-Transporter bei saurem pH (pH = 5) und ist an der Aufnahme von Succinat, Fumarat und Aspartat beteiligt (Karinou et al., 2013). Das *dauA*-Gen ist in *E. coli* stromabwärts von *fumC* bei 27,12 min lokalisiert. *B. subtilis* verfügt über ein mögliches DauA-homologes Protein, welches als YvdB bezeichnet wird. Es besitzt 37 % Sequenzidentität und 56 % Sequenzähnlichkeit zu DauA aus *E. coli* (Tab. E1). YvdB wird laut Proteindatenbank-Vorhersagen in die Familie der SLC26A/SulP-Transporter eingruppiert, zu welcher auch DauA gehört. *yvdB* ist stromaufwärts von *fumC* bei 84,45 min gelegen. Die Suche nach einem potentiellen DauA-Homologen in *G. kaustophilus* ergab keine Treffer.

Weitere C₄-Dicarboxylat Transporter sind in *G. kaustophilus* und *B. subtilis* nicht bekannt (Tab. E1). *E. coli* hingegen verfügt zusätzlich über die C₄-Dicarboxylat-Carrier der DcuA/B und DcuC-Familie. Den Haupt-Transporter unter anaeroben Bedingungen stellt der Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB dar (Six et al., 1994; Kleefeld et al., 2009). Das Gen *dcuB* ist stromabwärts des *dcuSR*-Operons lokalisiert und bildet ein Operon mit *fumB*, welches für die anaerob exprimierte Fumarase B kodiert. Die Expression des *dcuB/fumB*-Operons wird durch DcuSR induziert (Zientz et al., 1998). Bei DcuA handelt es sich um einen konstitutiv exprimierten Transporter, der hauptsächlich die Aufnahme von Fumarat im Symport mit drei Protonen katalysiert (Engel et al., 1994). DcuC wird unter fermentativen Bedingungen exprimiert und katalysiert vornehmlich den Efflux von Succinat im Symport mit drei Protonen (Zientz et al., 1996).

G. kaustophilus besitzt ein zu DctB aus *B. subtilis* (DctB_{Bs}) homologes Bindeprotein. DctB_{Bs} ist ein Bindeprotein der DctP-Familie und hat vermutlich eine Cosensor-Funktion für DctS (Asai et al., 2000; diese Arbeit). *In vivo* Interaktionsstudien zeigen die Interaktion von DctB_{Bs} mit DctS (vgl. 4.1.3). Interessanterweise ist das *dctB*-Gen in *G. kaustophilus* im Gegensatz zur Genlokalisierung von *B. subtilis* mit dem *dctA*-Gen kolokalisiert und wahrscheinlich wird es mit diesem kotranskribiert (Abb. E16). *E. coli* verfügt über ein Bindeprotein (YiaO), welches im C₄-Dicarbonsäurestoffwechsel jedoch keine Rolle spielt. YiaO ist an der Aufnahme eines Derivats der Ascorbinsäure, 2,3-Diketo-L-gulonat, beteiligt (Thomas et al., 2006).

Die Analyse des C₄-Dicarbonsäurestoffwechsels von *G. kaustophilus* im Vergleich zu jenem von *B. subtilis* und *E. coli* deutet darauf hin, dass das DcuSR/DctSR-homologe System wahrscheinlich ein aerobes System zur Erkennung von C₄-Dicarboxylaten ist. In den folgenden Abschnitten wird die DctS_{Gk}-Sensor kinase näher charakterisiert.

4.2.1 Substratspektrum von DctS_{Gk} im anaeroben und aeroben Komplementationstest

Die Funktionalität des DcuSR-Zweikomponentensystems aus *E. coli* kann durch die Aktivität einer *dcuB-lacZ*-Reporterfusion direkt gemessen werden. Plasmidkodiertes DcuS_{Ec} komplementiert die Funktion einer DcuS-Insertionsmutanten (Abb. E17).

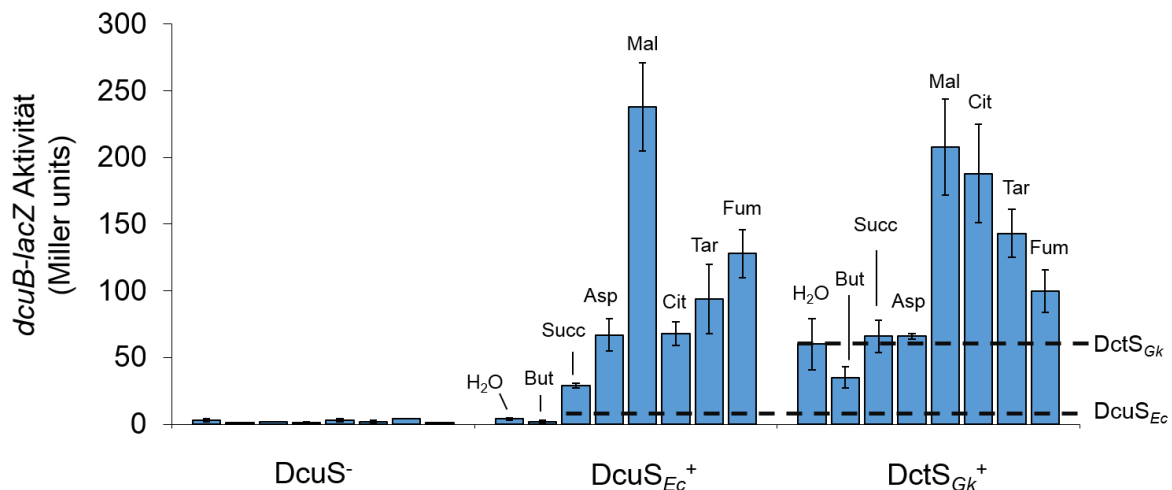


Abb. E17: **Substratspektrum von DctS_{Gk} im anaeroben Komplementationstest in *E. coli*: Induktion von *dcuB-lacZ*.** Zur Bestimmung der Effektoren von DctS_{Gk} wurde die *dcuB-lacZ* Expression in *E. coli* IMW260 ([MC4100 λ (Φ*dcuB'* - *lacZ*)], *dcuS*::*cam^R*) mit plasmidkodiertem DctS_{Gk} (pMW817) gemessen. Als Vergleich wurde die *dcuB-lacZ* Expression in *E. coli* IMW260 mit plasmidkodiertem DcuS_{Ec} (pMW151) gemessen. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin (50 mM), Gluconat (3 mM) und DMSO (20 mM), mit und ohne Zugabe der Effektoren (20 mM). Die Standardabweichung errechnete sich aus vier unabhängigen Zuchten in vier Parallelen. Abkürzungen: But, Butyrat; Succ, Succinat; Asp, Aspartat; Mal, L-Malat; Cit, Citrat; Tar, L-Tartrat; Fum, Fumarat.

Nach heterologer Expression von plasmidkodiertem DctS aus *G. kaustophilus* zeigt dieses ebenso Komplementation der DcuS-Funktion (Abb. E17). Für Komplementationsexperimente wurden die Zellen anaerob in Mineralmedium mit 50 mM Glycerin, 3 mM Gluconat und DMSO gezüchtet. Glycerin und Gluconat dienten als Kohlenstoffquellen, während DMSO als alternativer Elektronenakzeptor fungierte. Zur genaueren Charakterisierung des Substratspektrums von DctS_{Gk} wurde die Induktion der *dcuB*-Expression in Abhängigkeit verschiedener Mono-, Di-, und Tricarbonsäuren gemessen und mit dem Substratspektrum von DcuS_{Ec} verglichen (Abb. E17). Im Unterschied zu DcuS aus *E. coli* stimuliert DctS_{Gk} bereits ohne Zugabe von Effektoren die *dcuB*-Expression. Diese Basalaktivität wird durch die Zugabe der C₄-Dicarbonsäure Malat um den Faktor 3, durch L-Tartrat und Fumarat um den Faktor 2 bzw. 1,7 gesteigert. Die Zugabe der C₆-Tricarbonsäure Citrat führt ebenso zur Induktion der *dcuB*-Expression. Diese steigert die Expression um den Faktor 3. Die DctS_{Gk} Effektoren mit der höchsten Induktionssteigerung im heterologen System sind somit die C₄-Dicarbonsäure Malat sowie die C₆-Tricarbonsäure Citrat. Die C₄-Dicarbonsäuren Succinat und Aspartat sowie die C₄-Monocarbonsäure Butyrat dienen DctS_{Gk} nicht als Effektoren (Abb. E17).

G. kaustophilus zeigt auf den C₄-Dicarbonsäuren Fumarat, Malat, Succinat und Aspartat besseres Wachstum als auf verwandten Säuren wie zum Beispiel Butyrat (Graf, 2009). Wachstum auf Citrat ist in *G. kaustophilus* nicht möglich. Dieses Wachstumsverhalten zeigt Übereinstimmungen sowie Unterschiede zu den Komplementationsexperimenten. Fumarat und Malat sind sowohl gute Wachstumssubstrate für *G. kaustophilus* als auch Induktoren für DctS_{Gk}. Succinat und Aspartat hingegen sind Wachstumssubstrate, die sich jedoch nicht als Induktoren für DctS_{Gk} erwiesen. Die C₆-Tricarbonsäure Citrat dient *G. kaustophilus* nicht als Wachstumssubstrat, DctS_{Gk} jedoch als Induktor. Butyrat ist für *G. kaustophilus* kein gutes Wachstumssubstrat und zeigt auch keine Induktion der *dcuB*-Expression.

Im Vergleich zu DctS_{Gk} erkennt plasmidkodiertes DcuS_{Ec} alle getesteten Effektoren mit Ausnahme von Butyrat. Malat ist wie bei DctS_{Gk} der Effektor mit der höchsten Steigerung der *dcuB*-Expression. Die Expression wird mit Malat um das 60-fache erhöht. Citrat induziert die Expression nicht im gleichen Maße wie mit DctS_{Gk}. Die *dcuB*-Expression nach Zugabe von Citrat ist um den Faktor 3 geringer als mit DctS_{Gk} (Abb. E17). Weitere Effektoren von DcuS_{Ec} sind D-Tartrat, Maleinat und 3-Nitropropionat (Kneuper et al., 2005). Diese wurden hier nicht getestet.

Wie bereits erläutert, erfolgt die Stimulation der *dcuB*-Expression mit DctS_{Gk} bereits ohne Zugabe von Effektoren. Diese kann jedoch durch die Effektoren von DctS_{Gk} um den Faktor 2 bis 3 gesteigert werden. Es wurde vermutet, ob DctS_{Gk} für die Regulation seiner Aktivität ähnlich wie DcuS_{Ec} von akzessorischen Proteinen abhängig ist. Die erhöhte Basalaktivität von DctS_{Gk} könnte demnach durch das Fehlen dieser Proteine ausgelöst werden. DcuS_{Ec} benötigt unter Aerobiose DctA und unter anaeroben Bedingungen DcuB als Cosensor (Witan et al., 2012a). Für DctS_{Gk} kommen als potentielle Cosensoren der aerobe Transporter DctA sowie das Bindeprotein DctB in Frage. Nach Coexpression von DctA_{Gk} und DctB_{Gk} mit der Sensor kinase DctS_{Gk} in *E. coli* zeigte sich jedoch keine signifikante Änderung der *dcuB*-Expression im anaeroben Komplementationstest (Graf, 2009). DctS_{Gk} stammt aus einem grampositiven, thermophilen Organismus und wird in dem gramnegativen, mesophilen Bakterium *E. coli* exprimiert. Möglicherweise ist die erhöhte Basalaktivität von DctS_{Gk} ein Effekt der veränderten Umgebungsbedingungen für die Sensor kinase. So kann zum Beispiel die Temperatur die Aktivität der Sensor kinase beeinflussen. Die Komplementationsexperimente mit DctS_{Gk} wurden in *E. coli* bei 37°C durchgeführt. *G. kaustophilus* zeigt bei 37 °C kein Wachstum, die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 55°C und 60°C.

Zur Überprüfung der Funktionalität des DcuSR-Systems unter aeroben Bedingungen kann die Aktivität einer *dctA-lacZ* Reporter gen fusion gemessen werden. Plasmidkodiertes DctS_{Gk} zeigt ähnlich wie DcuS_{Ec} Komplementation der DcuS-Funktion mit den getesteten Effektoren Fumarat, Succinat und Malat (Abb. E18). Die Basalaktivität von DctS_{Gk} ist hierbei wie im anaeroben Komplementationstest erhöht. Diese lässt sich mit Fumarat und Malat um den

Faktor 2,5 bzw. 2 steigern. Succinat steigert die *dctA*-Expression um den Faktor 2,5 und ist somit im aeroben Komplementationstest ein Induktor von DctS_{Gk}. Die *dcuB*-Expression konnte mit DctS_{Gk} nach Zugabe von Succinat nicht gesteigert werden (Abb. E17).

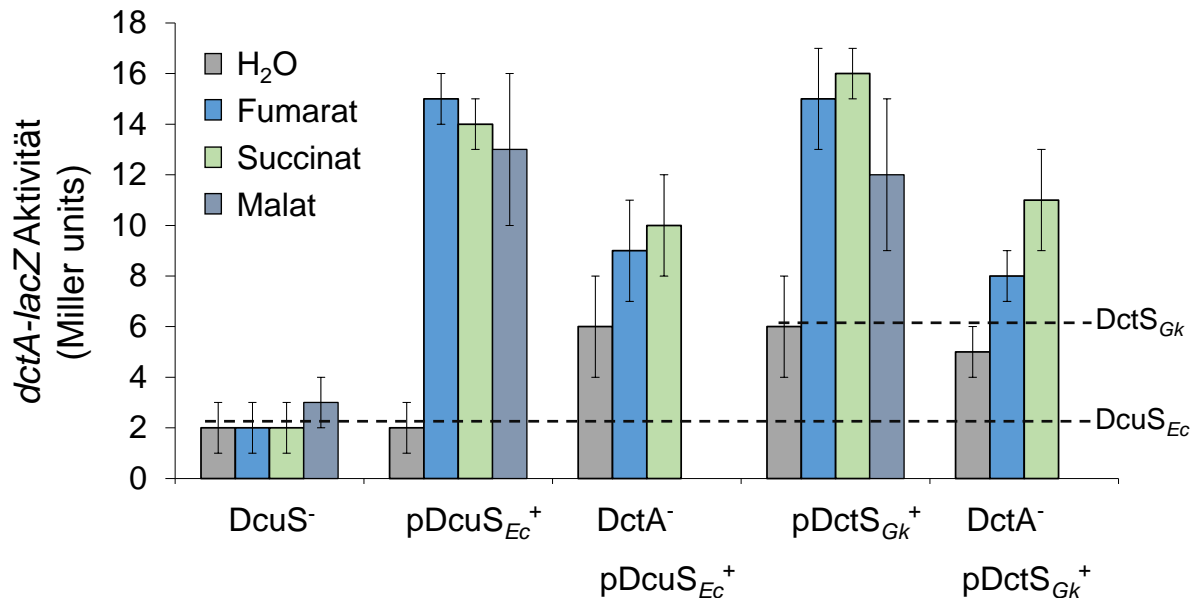


Abb. E18: **Aerobe Komplementation von DcuS_{Ec} durch DctS_{Gk}: Induktion von *dctA-lacZ*** In den Stämmen IMW389 (DcuS⁻) und IMW538 (DcuS⁻ DctA⁻) wurde die Expression der chromosomal kodierten *dctA-lacZ* Reporterfusion mit sowie ohne plasmidkodiertem DcuS_{Ec} (pMW151) bzw. DctS_{Gk} (pMW817) gemessen. Die Zucht erfolgte aerob in eM9-Medium mit 25 mM Glycerin und mit bzw. ohne Zugabe der Effektoren (20 mM). Die *dctA-lacZ* Aktivität der Stämme wurde in der post-exponentiellen Phase bestimmt. Die Standardabweichung errechnete sich aus vier unabhängigen Zuchten in vier Parallelen.

Unter aeroben Bedingungen spielt DctA in *E. coli* eine wichtige Rolle als Cosensor für DcuS. Die C-terminale, cytosolische Helix 8b von DctA interagiert mit DcuS (Witan et al., 2012a; 2012b). Bei Abwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren führt diese Interaktion zur Hemmung der Kinaseaktivität von DcuS. Daher kommt es zu einer Effektor-unabhängigen *dctA-lacZ* Expression im DctA-negativen Hintergrund (Witan, 2012; Abb. E18). Im DctA-negativen Hintergrund mit plasmidkodiertem DctS_{Gk} zeigt sich eine Reduktion der Effektor-Induktion, welche in einer teilweisen Effektor unabhängigen *dctA*-Expression resultiert (Abb. E18). Die *dctA*-Expression kann mit Fumarat nicht mehr signifikant gesteigert werden und zeigt mit Succinat eine geringere Steigerung im Vergleich zum DctA-positiven Hintergrund. Möglicherweise ist im heterologen System DctS_{Gk} auf DctA_{Ec} als Cosensor angewiesen.

4.2.2 Untersuchung von PASp-Mutanten in DctS_{Gk}

Im heterologen Expressionssystem in *E. coli* fungieren die C₄-Dicarbonsäuren Malat, Fumarat und L-Tartrat sowie die C₆-Tricarbonsäure Citrat als Effektoren für DctS_{Gk}. Die DctS_{Gk} vermittelte Induktion der *dcuB*-Expression in *E. coli* setzt die Erkennung der Carbonsäuren durch DctS_{Gk} voraus. Die Ligandenbindung von DcuS aus *E. coli* erfolgt über die periplasmatische PAS (PASp) Domäne, welche zwischen den beiden Transmembranhelices des Proteins lokalisiert ist (Kneuper et al., 2005; Cheung and Hendrickson, 2008). DctS_{Gk} verfügt ebenso über eine PASp-Domäne, in welcher die vorhergesagten Sekundärstrukturelemente mit Ausnahme des β -Faltblatts $\beta 2$ konserviert sind (Abb. E19). Die Struktur der PASp-Domäne von DcuS_{Ec} wurde durch NMR-Spektroskopie ohne gebundenen Effektor sowie mittels Röntgenkristallographie mit dem Effektor Malat bestimmt (Pappalardo et al., 2003; Cheung and Hendrickson, 2008). Diese umfasst einen Kern aus fünf β -Faltblättern, der von beiden Seiten durch α -helicale Bereiche flankiert wird. Die Effektor-Bindestelle wird durch Aminosäurereste in den zentralen β -Faltblättern und zwei Schleifenregionen zwischen den β -Faltblättern $\beta 1$ und $\beta 2$ sowie $\beta 3$ und $\beta 4$ gebildet (Cheung and Hendrickson, 2008; Kneuper et al., 2010; Scheu et al., 2010). Die für die Bindung der Effektoren essentiellen Aminosäurereste sind in DctS_{Gk} größtenteils konserviert (Abb. E19).

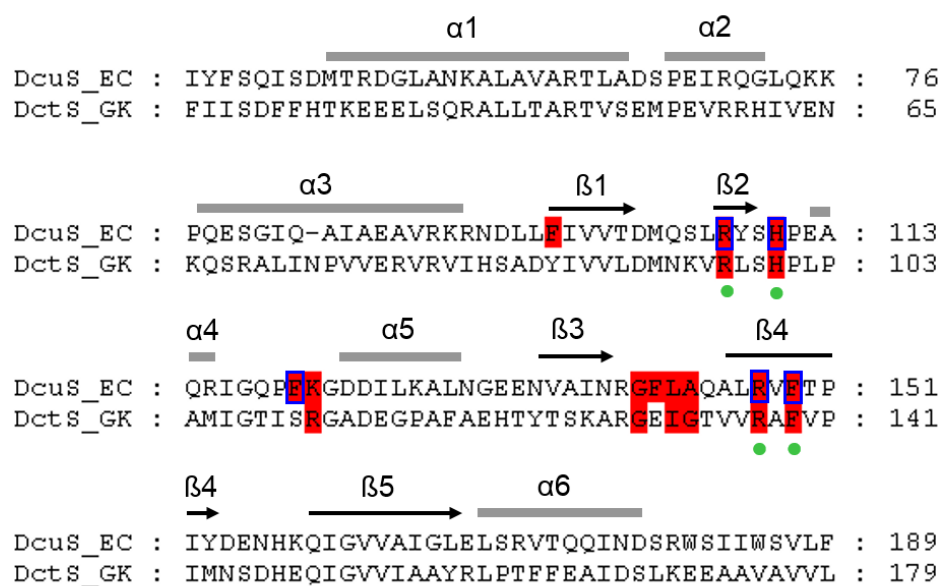


Abb. E19: **Konservierte Fumaratbindestelle in der PASp-Domäne von DctS_{Gk}.** Das Alignment zeigt die PASp-Domänen von DctS_{Gk} und DcuS_{Ec}. Die für die Fumaratbindung essentiellen Reste von DcuS_{Ec} sind rot markiert und wurden in der Kristallstruktur gelöst (F97, R107, H110, F120, K121, G140, F141, L142, A143, R147; Cheung and Hendrickson, 2008). Die blau umrandeten Reste wurden zusätzlich durch Mutationsanalyse identifiziert (R107, H110, F120, R147, F149; Kneuper et al., 2005). Eine Ausnahme bildet der Rest F149 in DcuS_{Ec}, welcher nur durch Mutationsanalysen, nicht aber durch Strukturanalysen als essentieller Rest identifiziert wurde (Scheu et al., 2010). Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten DctS_{Gk}-Einzelmutanten sind mit grünen Punkten unterhalb der jeweiligen Aminosäure markiert. Die Sekundärstrukturelemente der PASp-Domäne von DcuS_{Ec} sind oberhalb der Aminosäuresequenz als graue Balken (α -Helices) bzw. Schwarze Pfeile (β -Faltblätter) dargestellt und wurden mittels PSIPRED (Jones, 1999) vorhergesagt. Mit Ausnahme des fehlenden $\beta 2$ -Faltblatts ist die vorhergesagte Sekundärstruktur der PASp-Domäne von DctS_{Gk} identisch zu DcuS_{Ec}.

Acht der elf essentiellen Reste von DcuS_{Ec} sind in DctS_{Gk} identisch oder durch isofunktionelle Reste ausgetauscht. Die Bedeutung der konservierten Reste in DctS_{Gk} für die Induktion der *dcuB*-Expression im heterologen System wurde durch vier DctS_{Gk}-Einzelmutanten und drei Doppelmutanten untersucht (Tab. E2). Hierfür wurden Aminosäurereste ausgewählt, welche in DcuS_{Ec} zu einem Verlust der *dcuB*-Expression führten (Kneuper et al., 2005). So konnte die *dcuB*-Expression mit jener der entsprechenden DcuS_{Ec}-Einzelmutanten verglichen werden. Beispielfhaft ist die *dcuB*-Expression mit plasmidkodiertem DcuS_{Ec} als Wildtyp sowie als R147A-Mutante aufgeführt (Tab. E2). Alle weiteren DcuS_{Ec}-Mutanten (R107A, H110A, F120A und F149A) führen ebenso zu einem völligen Verlust der *dcuB*-Induktion nach Fumaratzugabe.

Tab. E2: ***dcuB*-Expression in Einzel- und Doppelmutanten konservierter Reste der PASp-Domäne von DctS_{Gk}.** *E. coli* IMW260 ([MC4100 λ (Φ*dcuB*' - '*lacZ*)], *dcuS*::*cam*^R) wurde mit wildtypischem oder mutiertem DctS_{Gk} (pMW817) oder DcuS_{Ec} (pMW151) transformiert. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin (50 mM), Gluconat (3 mM) und DMSO (20 mM), mit und ohne Zugabe von Fumarat (20 mM). Die Standardabweichung errechnete sich aus vier unabhängigen Zuchten in vier Parallelen. Bei der Analyse der DctS_{Gk} Einzelmutanten ist der korrespondierende Rest in DcuS_{Ec} in Klammern hinzugefügt.

Stämme (relevanter Genotyp)	β-Galaktosidase (<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i>) [Miller units]	
	H ₂ O	Fumarat
DcuS_{Ec}		
Wt	3 ± 1	128 ± 18
R147A	4 ± 1	5 ± 1
DctS_{Gk}		
Wt	44 ± 8	93 ± 6
R97A (DcuS _{Ec} : R107)	29 ± 10	78 ± 11
H100A (DcuS _{Ec} : H110)	39 ± 8	77 ± 10
R137A (DcuS _{Ec} : R147)	27 ± 7	115 ± 6
F139A (DcuS _{Ec} : F149)	38 ± 18	87 ± 17
R97A + F139A	5 ± 1	64 ± 1
H100A + F139A	9 ± 6	62 ± 16
R137A + H100A	13 ± 0	74 ± 1

Die entsprechenden Einzelmutanten in DctS_{Gk} zeigen keine signifikante Änderung der *dcuB*-Induktion nach Fumaratzugabe (Tab. E2). Wie mit wildtypischem DctS_{Gk} lässt sich eine erhöhte Basalaktivität erkennen, die durch Fumaratzugabe um den Faktor 2 gesteigert wird. Bei der Mutanten R137A ist die Basalaktivität etwas niedriger und wird nach Zugabe von Fumarat um den Faktor 4 gesteigert. Offensichtlich ist der Austausch eines einzelnen

konservierten Aminosäurerestes in DctS_{Gk} nicht ausreichend, um die Bindung von Fumarat zu verhindern. Daher wurde der Einfluss von Doppelmutanten in DctS_{Gk} auf die *dcuB*-Induktion untersucht (Tab. E2). Hierfür wurden drei verschiedene Kombinationen von Doppelmutanten getestet, deren Aminosäurereste zuvor als Einzelmutante getestet wurden. Bei Analyse der Doppelmutanten zeigte sich weiterhin eine *dcuB*-Induktion nach Fumaratzugabe (Tab. E2). Auffällig ist die prinzipiell etwas geringere *dcuB*-Expression, wobei die Expression ohne Zugabe von Effektoren im Vergleich zu wildtypischem DctS_{Gk} stärker sinkt als jene nach Fumaratzugabe. Dadurch wird die *dcuB*-Expression um einen Faktor von 5 (R137A + H100A) bis 12 (R97A + F139A) anstelle von 2 (wildtypisches DctS_{Gk}) nach Zugabe von Fumarat gesteigert.

Die Analyse der Einzel- und Doppelmutanten von DctS_{Gk} lässt vermuten, dass das Ausschalten weniger konservierter Aminosäurereste nicht wie in DcuS_{Ec} zu einem Verlust der Fumaratbindung führt. Die Herstellung von Triple- oder höheren Mehrfachmutanten erhöht die Wahrscheinlichkeit der Zerstörung der Struktur von Proteinen. Daher wurden weitere Mehrfachmutanten in DctS_{Gk} nicht getestet. Die Seitenketten der äquivalenten Reste in PAsp von DcuS_{Ec} R107, H110 und R147 sind an der Bildung von Wasserstoffbrücken zu dem gebundenen Malat beteiligt (Cheung und Hendrickson, 2008). Wahrscheinlich werden ebenso zwischen gebundenem Fumarat und den Seitenketten dieser Aminosäuren Wasserstoffbrücken ausgebildet. Möglicherweise können in den DctS_{Gk} Einzel- und Doppelmutanten andere Aminosäurereste die Bildung der Wasserstoffbrücken übernehmen oder die Bindung durch die noch verbleibenden Reste reicht für die Fumaraterkennung aus. Die DcuS_{Ec} R147A Mutante zeigt nach Fumaratzugabe einen vollständigen Verlust der *dcuB*-Expression. Nach Malatzugabe hingegen geht die Expression nicht vollständig verloren, die Aktivität des Reportergens liegt nur geringfügig unterhalb der Aktivität mit wildtypischem DcuS_{Ec} (Wörner, 2013). Somit sind in dieser Mutanten für die Erkennung von Malat wahrscheinlich die noch verbleibenden Reste der PAsp-Domäne ausreichend, wenn auch die Ligandenbindung nicht mehr so effizient zu sein scheint.

4.2.3 Rekonstitution von DctS_{Gk} in *E. coli* Liposomen

Sensorkinasen wie DcuS_{Ec} sind *in vitro* nur nach Rekonstitution in Membranen funktional (Janausch et al., 2002a; Kneuper et al., 2005). Mit der Rekonstitution werden *in vitro* für das Protein ähnliche Bedingungen wie *in vivo* in der Zellmembran geschaffen. Daher wurde zur *in vitro* Analyse von DctS_{Gk} dieses in Liposomen bestehend aus *E. coli* Phospholipiden eingebaut. Zunächst erfolgte eine Destabilisierung der Liposomen durch das Detergenz TritonX-100. Dabei kommt es zur Bildung von Detergenz-Lipid Micellen. Zu diesen wurde His₆-gereinigtes DctS_{Gk} im Protein:Lipid-Verhältnis von 1:20 gegeben, entsprechend einem Proteinmolekül pro ca. 1400 Lipidmolekülen. Anschließend wurde das Detergenz mit Bio Beads (Holloway, 1973) langsam entfernt. Dabei kommt es zum Einbau des Proteins in die Phospholipide und es bildet sich eine Lipid-Doppelschicht mit dem integralen Membranprotein aus. Rekonstituiertes Protein wird von nicht rekonstituierten Proteinanteilen durch Ultrazentrifugation getrennt. Die Proteoliposomen wurden vor der Verwendung dreimal schockgefroren und bei Raumtemperatur langsam wieder aufgetaut, um unilamellare Liposomen zu erhalten. Der Einbau von DctS_{Gk} in Liposomen erfolgt wahrscheinlich wie im Falle von DcuS_{Ec} in einer „inside out“-Orientierung (Abb. E20; Janausch et al., 2002a).

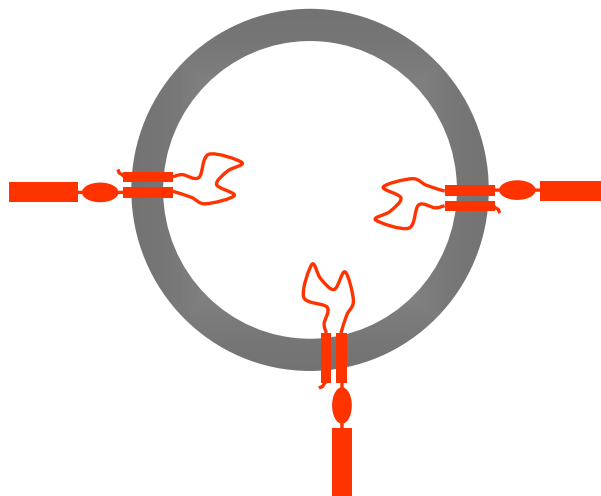


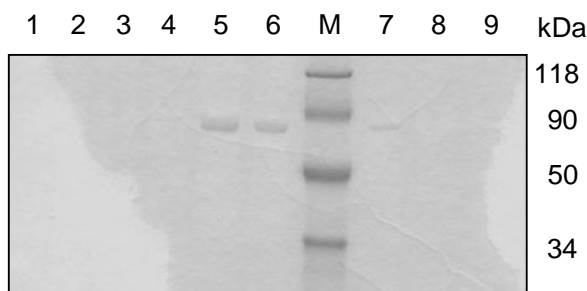
Abb. E20: **Modell der „inside-out“ Orientierung von DcuS / DctS nach Rekonstitution in Liposomen.** Die periplasmatische PAS-Domäne ist dabei nach innen gerichtet, während sich die cytoplasmatische PAS-Domäne sowie die Kinasedomäne außerhalb befinden.

Bei dieser Orientierung ist der größte hydrophile Anteil des Proteins außerhalb der Liposomen lokalisiert. Der Einbau des Proteins in dieser Orientierung ist energetisch günstiger als in der umgekehrten Orientierung. Für die Sensorkinasen KdpD und PhoQ wurde die „inside-out“ Orientierung in Liposomen durch Proteasezugänglichkeit bzw. Zugänglichkeit für Thiolreagenzien bestimmt (Jung et al., 1997; Sanowar und Le Moual, 2005).

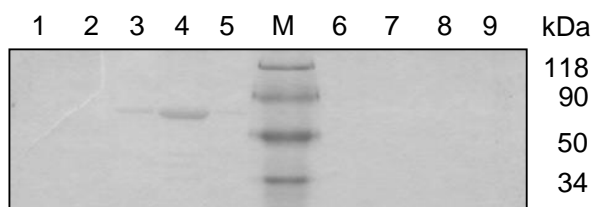
Zur Überprüfung der Rekonstitution von DctS_{Gk} wurde eine Saccharosedichtegradientenzentrifugation durchgeführt (Abb. E21). Mit dieser erfolgt über

einen ansteigenden Saccharosegehalt von 0-45 % eine Trennung des membranintegralen Proteins von löslichem Protein sowie Proteinaggregaten. Nicht funktional eingebaute Proteine aggregieren (Abb. E21C, Fraktion 1) oder befinden sich in der löslichen Proteinfraction (Abb. E21C, Fraktion 7-9). Membranintegrale Proteine sind bei einem Saccharosegehalt von 10-20% zu finden (Abb. E21C, Fraktion 4-6). Die Saccharosedichtegradientenzentrifugation wurde mit rekonstituiertem DctS_{Gk} und als Vergleich mit einer entsprechend rekonstituierten DcuS_{Ec}-Probe durchgeführt. Anschließend wurden die Proteinfractionen durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf einen Western-Blot übertragen und mittels His₆-Antikörper nachgewiesen (Abb. E21A und B). Dabei war DctS_{Gk} hauptsächlich in den Fraktionen 5 und 6 und DcuS_{Ec} in Fraktion 4 zu finden. Dies bestätigt den Einbau von DctS_{Gk} bzw. DcuS_{Ec} in Liposomen.

A: DctS_{Gk}



B: DcuS_{Ec}



C

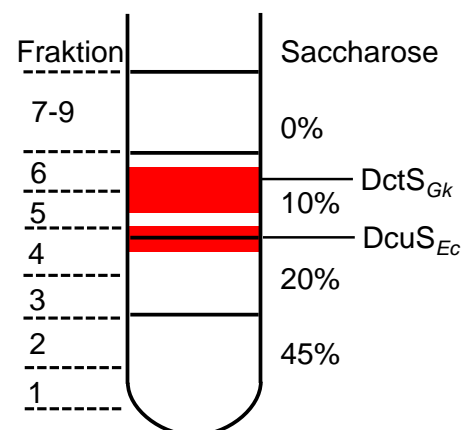


Abb. E21: **Nachweis der Rekonstitution von DctS_{Gk} in Liposomen im Vergleich zu DcuS_{Ec} mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation.** Der Gradient wurde in 9 Fraktionen aufgeteilt und mittels SDS-PAGE analysiert. (A) und (B) SDS-PAGE von DctS_{Gk} (A) und DcuS_{Ec} (B) nach Rekonstitution mit einem Reff-Wert von 2,5. Jeweils 20 µl der einzelnen Fraktionen des Gradienten wurden mit Coomassie gefärbt und analysiert. Spuren 1-9: Fraktionen 1-9, M: Proteinstandard. (C) Aufbau des Saccharose-Dichtegradienten. Der Gradient war in Stufen von 45, 20, 10 und 0 % Saccharose angelegt. Die 0 %ige Saccharoselösung wurde mit der Probe überschichtet. Die rote Bande gibt die Lage der Lipidbande im Gradienten wieder, die durch eine Trübung zu beobachten war.

Der Einbau von DctS_{Gk} bzw. DcuS_{Ec} in Liposomen wurde mittels Bestimmung der Bandenintensität des rekonstituierten sowie nicht-rekonstituierten Proteinanteils auf einem SDS-Gel quantifiziert. Die Ermittlung der Bandenintensität erfolgte dabei durch das Programm Gel Pro Analyzer 6.0 mit Hilfe einer Referenz-Proteinprobe auf dem SDS-Gel (Tab. E3). DctS_{Gk} wurde demnach zu 86 % und DcuS_{Ec} zu 96% in Liposomen eingebaut.

Tab. E3: **Quantifizierung des Einbaus von DctS_{Gk}/DcuS_{Ec} in Liposomen.** Je 20 µl der Proteoliposomen sowie des Überstandes nach Abtrennung nicht rekonstituierter Anteile wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Mittels einer Referenz-Proteinprobe wurde die Proteinmenge an rekonstituiertem Protein und Überstand durch die Bestimmung der Bandenintensität mit Hilfe des Programms Gel Pro Analyzer 6.0. ermittelt.

Protein	Eingesetzte Proteinmenge [µg]	Rekonstituiertes Protein [µg]	Einbau in Liposomen [%]
DctS _{Gk}	350	300	86
DcuS _{Ec}	344	330	96

4.2.4 *In vitro* Phosphorylierung von DctS_{Gk}

Eine wichtige Eigenschaft von Sensorhistidinkinasen ist neben der Signalerkennung über eine sensorische Domäne die Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes über eine Kinasedomäne. Die Fähigkeit zur Signalerkennung von DctS_{Gk} wurde durch *in vivo* Komplementationsstudien im heterologen System in *E. coli* nachgewiesen (vgl. 4.2.1). Für die Untersuchung der Autophosphorylierungsaktivität von DctS_{Gk} wurde ein *in vitro* Testsystem angewendet, welches für Phosphorylierungsstudien von DcuS aus *E. coli* etabliert wurde (Janausch et al., 2002a). Histidinkinasen bilden Dimere oder höhere Oligomere aus, bei welchen die Kinasedomäne eines Monomers den Histidinrest des anderen Monomers phosphoryliert. Die Phosphorylierung erfolgt an einem konservierten Histidinrest in der Dimerisierungsdomäne des Proteins. Die Dimerisierungsdomäne besteht aus 2 α-Helices, welche sich in der Sekundärstruktur direkt N-terminal zur Kinasedomäne befinden. Die Kinasedomänen verschiedener Sensorhistidinkinasen sind hoch konserviert (West und Stock, 2001). Sie zeichnen sich durch besonders konservierte Sequenzbereiche aus, die gemäß der am stärksten konservierten Aminosäure des Bereiches als N-, G1-, F- und G2-Boxen bezeichnet werden. Diese Sequenzbereiche bilden die ATP-Bindetasche der Domäne (West und Stock, 2001). DctS_{Gk} verfügt über eine Kinasedomäne, welche 35 % Sequenzidentität zu jener von DcuS_{Ec} besitzt (Abb. E22). Die typischen Aminosäurereste einer Kinasedomäne (N-, G1-, F-, G2) sind in DctS_{Gk} konserviert. Der für die Phosphorylierung von DcuS_{Ec} essentielle Rest H349 der Dimerisierungsdomäne ist in DctS_{Gk} ebenfalls konserviert (H335 in DctS_{Gk}). Histidinkinasen besitzen eine charakteristische Sekundärstruktur, welche laut Vorhersage in DctS_{Gk} konserviert ist (Abb. E22).

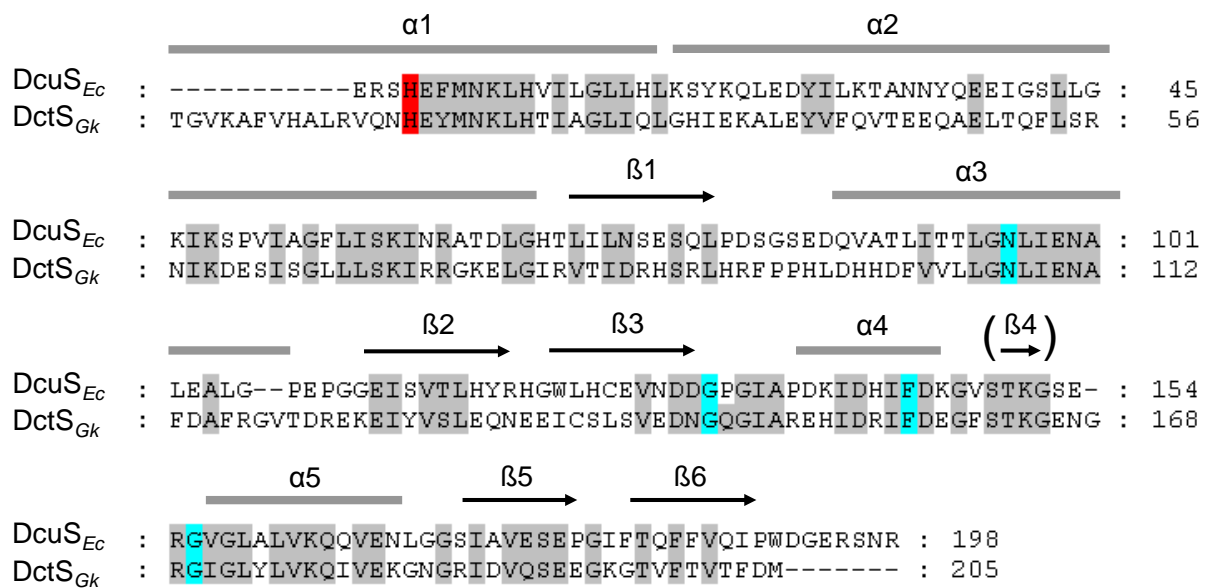


Abb. E22: Vergleich der Primärsequenz und der vorhergesagten Sekundärstruktur der Dimerisierungs- und Kinasedomäne von DcuS_{Ec} und DctS_{Gk}. Sequenzähnlichkeiten laut ClustalW2 sind grau unterlegt. Die in Histidinkinasen konservierten Bereiche der Dimerisierungsdomäne (H-Box; Parkinson und Kofoid, 1992) sowie der Kinasedomäne (N-, G1-, F-, G2-Boxen; Parkinson und Kofoid, 1992) sind rot bzw. blau unterlegt. Die Sekundärstrukturanalyse erfolgte mittels PSIPRED (Jones, 1999). Die Sekundärstrukturelemente der Dimerisierungs- und Kinasedomäne von DcuS_{Ec} sind oberhalb der Aminosäuresequenz als graue Balken (α -Helices) bzw. schwarze Pfeile (β -Faltblätter) dargestellt. Mit Ausnahme des fehlenden $\beta 4$ -Faltblatts ist die vorhergesagte Sekundärstruktur von DctS_{Gk} identisch zu DcuS_{Ec}.

Bestimmung der Kinaseaktivität von DctS_{Gk} im Vergleich zu DcuS_{Ec}

Die Kinaseaktivität von DctS_{Gk} wurde nach Rekonstitution des Proteins in Liposomen durch Zugabe von radioaktiv markiertem [γ -³³P]ATP bestimmt. Die Inkubation mit 0,1 μ M [γ -³³P]ATP wurde durch Zugabe von SDS-haltigem Puffer gestoppt. Anschließend erfolgte eine Auftrennung des Proteins durch SDS-Gelelektrophorese. Die radioaktive Markierung von DctS_{Gk} wurde mit einem Phosphoimager detektiert. Die Phosphorylierung von DctS_{Gk} im solubilisierten sowie im rekonstituierten Zustand wurde mit der Phosphorylierung eines identisch behandelten DcuS_{Ec}-Ansatzes verglichen (Abb. E23). DcuS_{Ec} zeigte nur nach Einbau in Liposomen Phosphorylierung, das Protein besitzt in Detergenz-gelöster Form keine physiologische Aktivität (Janausch et al., 2002a). Bei DctS_{Gk} war bereits im solubilisierten Zustand eine geringe Phosphorylierungsaktivität erkennbar, welche nach Einbau in Liposomen jedoch stark erhöht wurde (Abb. E23). Eine offensichtlich stärkere Phosphorylierung von DctS_{Gk} im Vergleich zu DcuS_{Ec} war durch die intensivere Schwärzung der Proteinbande im Autoradiogramm erkennbar. Die Kinasedomäne von DctS_{Gk} war wie bei DcuS_{Ec} ohne Vorbehandlung für radioaktives ATP zugänglich. Dies spricht für eine „inside-out“ Orientierung des Proteins in Liposomen.

Zur quantitativen Analyse der Autophosphorylierung wurde rekonstituiertes DctS_{Gk} mit physiologischen [γ -³³P]ATP-Konzentrationen (2–10 mM) inkubiert. Nach SDS-

Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden ausgeschnitten und deren Radioaktivität mit einem Szintillationszähler gemessen. Pro phosphoryliertem Proteinmolekül wird ein ATP-Molekül verbraucht. Daher wurde die Menge an phosphoryliertem DctS_{Gk} aus der spezifischen Radioaktivität der [γ -³³P]ATP-Lösung berechnet und auf die eingesetzte Gesamtmenge an DctS_{Gk} bezogen. Die Kinaseaktivität von DctS_{Gk} zeigte eine Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. E24). Es erfolgte eine Zunahme an phosphoryliertem DctS_{Gk} in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit 2 mM [γ -³³P]ATP. Die Substratsättigung stellte sich nach 7 Minuten ein, der t_{0,5}-Wert lag bei 2,5 Minuten.

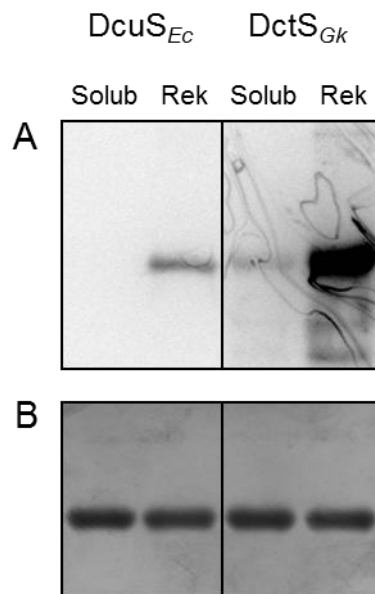


Abb. E23: **Phosphorylierung von solubilisiertem und rekonstituiertem DctS_{Gk} im Vergleich zu DcuS_{Ec}.** Mit 0,04 % LDAO solubilisiertes bzw. in Liposomen rekonstituiertes His₆-DctS_{Gk} (pMW817) oder His₆-DcuS_{Ec} (pMW151) wurden für 15 min mit 0,1 μ M [γ -³³P]ATP inkubiert. Je 5 μ g der Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Radioaktivität mit einem Phosphoimager detektiert. (A) Autoradiographie des SDS-Gels. (B) Coomassie-Färbung des SDS-Gels aus (A).

Rekonstituiertes DcuS_{Ec} kann *in vitro* bis zu 7 % phosphoryliert werden (Janausch et al., 2002a). Wahrscheinlich ist der restliche Anteil des Proteins nicht funktional oder aus energetischen Gründen durch ATP nicht weiter phosphorylierbar. Der maximal phosphorylierte Anteil an DctS_{Gk} wurde durch 30-minütige Inkubation mit 0,1–10 mM [γ -³³P]ATP bestimmt und mit der Phosphorylierung von DcuS_{Ec} verglichen (Abb. E25). Es wurden bis zu 18% DctS_{Gk} phosphoryliert, während die Phosphorylierung von DcuS_{Ec} bereits bei 2,2% des Proteins ihr Maximum erreichte. Somit scheint DctS_{Gk} im *in vitro* Testsystem stabiler zu sein als DcuS_{Ec} bzw. es ist ein größerer Anteil an funktionalem Protein vorhanden.

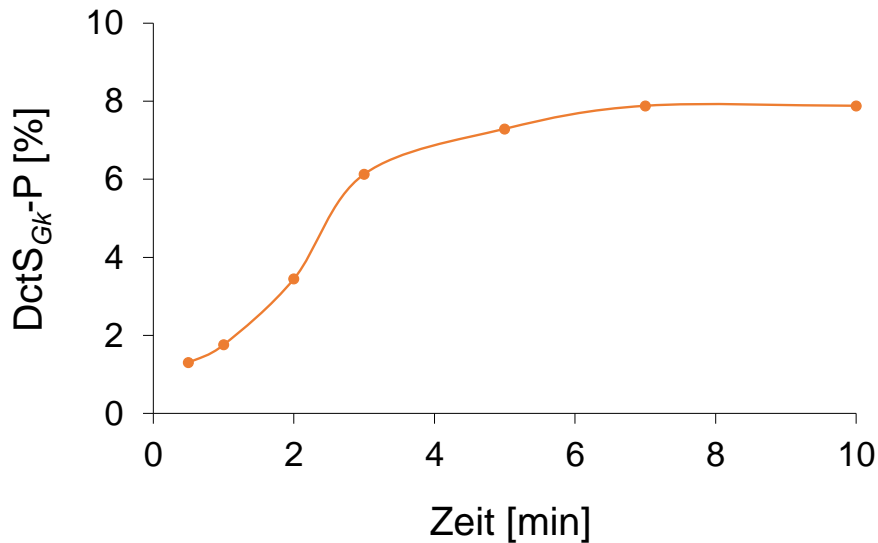


Abb. E24: **Kinetik der DctS_{Gk}-Autophosphorylierung mit 2 mM [γ -³³P]ATP.** Rekonstituiertes DctS_{Gk} wurde für 0,5 bis 10 min mit [γ -³³P]ATP inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Anteil an phosphoryliertem DctS_{Gk} wurde durch Messung der Radioaktivität der aus dem SDS-Gel ausgeschnittenen DctS_{Gk}-Banden bestimmt.

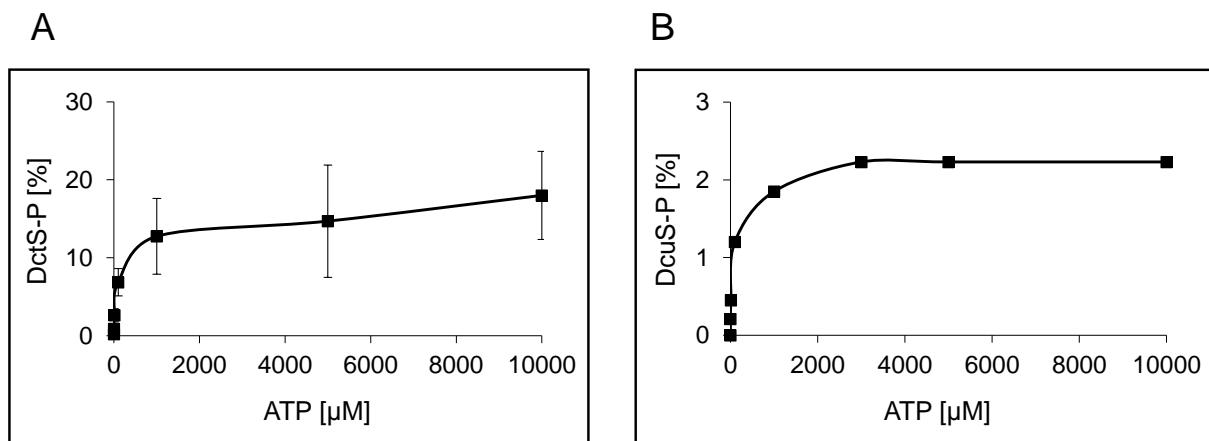


Abb. E25: **Phosphorylierung von DctS_{Gk} (A) und DcuS_{Ec} (B) mit steigender ATP-Konzentration.** Rekonstituiertes DcuS/DctS wurde für 30 min mit 0,1 mM–10 mM [γ -³³P]ATP inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Anteil an phosphoryliertem DcuS/DctS wurde durch Messung der Radioaktivität der aus dem SDS-Gel ausgeschnittenen Proteinbanden bestimmt.

Die Bestimmung des K_D -Wertes für ATP ergab verglichen mit DcuS_{Ec} eine 10-fach höhere Substrataffinität von DctS_{Gk} (Abb. E26). Halbmaximale Phosphorylierungsgeschwindigkeit wurde bei DctS_{Gk} bereits bei einer [γ -³³P]ATP-Konzentration von 43 μ M erreicht. Der K_D -Wert von DcuS_{Ec} für ATP lag bei einer [γ -³³P]ATP-Konzentration von 420 μ M.

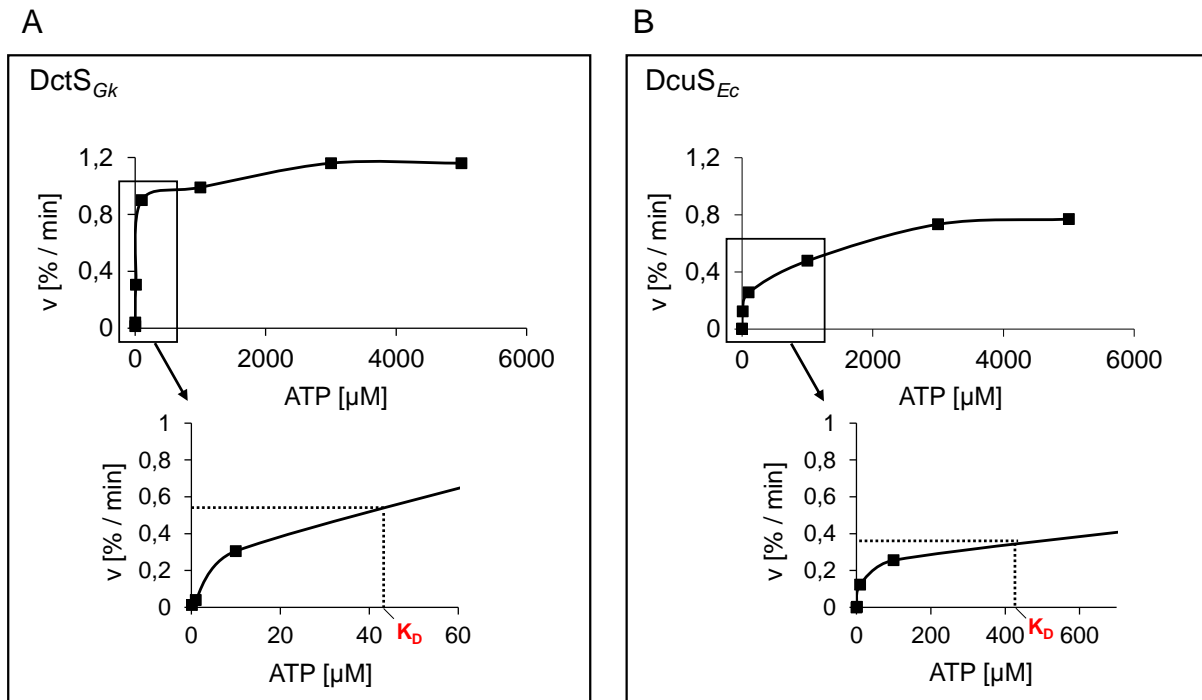


Abb. E26: **Bestimmung des K_D -Wertes von $DctS_{Gk}$ (A) und $DcuS_{Ec}$ (B) für ATP.** Rekonstituiertes DctS/DcuS wurde für 5 min mit 0,1 mM–5 mM $[\gamma^{33}P]ATP$ inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und deren Radioaktivität in einem Szintillationszähler gemessen. Die Menge an phosphoryliertem Protein wurde aus der spezifischen Radioaktivität der $[\gamma^{33}P]ATP$ -Lösung berechnet und zur eingesetzten Protein-Gesamtmenge ins Verhältnis gesetzt. Zur Berechnung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit v wurde der prozentuale Anteil an phosphoryliertem Protein durch die Inkubationszeit mit $[\gamma^{33}P]ATP$ dividiert. Die abgeschätzten K_D -Werte für ATP betragen für $DctS_{Gk}$ 43 μM und für $DcuS_{Ec}$ 420 μM .

Einfluss von C_4 -Dicarbonsäuren auf die Autophosphorylierung von $DctS_{Gk}$ und $DcuS_{Ec}$

In vivo fungieren C_4 -Dicarbonsäuren sowie die C_6 -Tricarbonsäure Citrat als Effektoren für die DcuSR-abhängige Genexpression in *E. coli* (vgl. 4.2.1). Mit plasmidkodiertem $DcuS_{Ec}$ wird die Expression des *dcuB-lacZ* Reportergens je nach Effektor um den Faktor 15-60 gesteigert. *In vitro* zeigt sich eine Stimulierung der Autophosphorylierung von $DcuS_{Ec}$ nur durch die Effektoren Fumarat und Succinat (Janausch et al., 2002a). Diese steigern die Phosphorylierung von $DcuS_{Ec}$ um den Faktor 3-6 mit Fumarat und 1,5- bis 3-fach mit Succinat. Die deutlich höhere Stimulierung der *dcuB*-Expression mit Fumarat (12-fach) bzw. Succinat (9-fach) wird vermutlich durch eine Amplifizierung des Signals durch das Sensor/Regulator Paar DcuSR hervorgerufen (Janausch et al., 2002a).

$DctS_{Gk}$ zeigt *in vivo* Spezifität für die C_4 -Dicarbonsäuren Malat, Fumarat, L-Tartrat sowie die C_6 -Tricarbonsäure Citrat (vgl. 4.2.1). Im heterologen System in *E. coli* mit plasmidkodiertem $DctS_{Gk}$ wird die *dcuB-lacZ* Reportergenexpression nach Zugabe dieser Effektoren um den Faktor 2-3 gesteigert. Zur Untersuchung der *in vitro* Spezifität der Sensorkinase wurde die Phosphorylierungsgeschwindigkeit von $DctS_{Gk}$ im Vergleich mit jener von $DcuS_{Ec}$ in Abhängigkeit von C_4 -Dicarbonsäuren und Citrat getestet. Phospholipidmembranen sind für

ionische und polare Substanzen undurchlässig. Da die beiden Sensorkinasen in einer „inside out“ Orientierung in Liposomen vorliegen, befindet sich die PASp-Domäne zur Erkennung der Effektoren im Lumen der Liposomen. Damit die Effektoren in das Innere der Proteoliposomen gelangen konnten, wurden diese mehrfach eingefroren und aufgetaut. Dadurch wird die Lipidmembran vorübergehend aufgebrochen und es kann so eine homogene Verteilung der Effektoren gewährleistet werden. Zur Bestimmung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit wurde rekonstituiertes DctS_{Gk} bzw. DcuS_{Ec} für 4 min mit 200 µM [γ -³³P]ATP in An- und Abwesenheit von 40 mM der Effektoren inkubiert (Abb. E27).

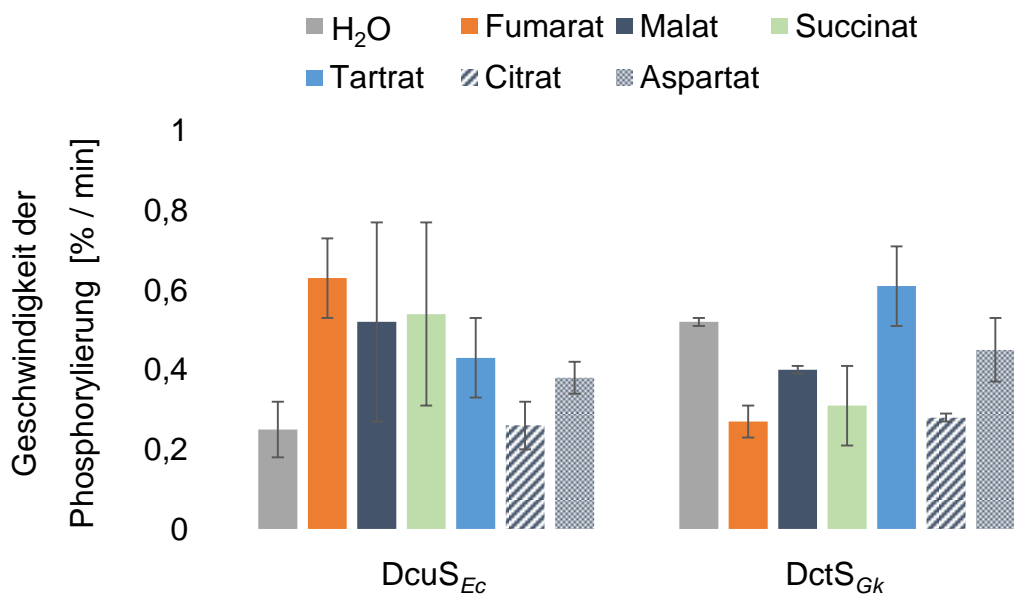


Abb. E27: **Einfluss von C₄-Dicarbonsäuren auf die Geschwindigkeit der DcuS_{Ec}/DctS_{Gk} Autophosphorylierung.** Rekonstituiertes His₆-DcuS_{Ec} (pMW151) oder His₆-DctS_{Gk} (pMW817) wurden mit oder ohne Zugabe von 40 mM der Effektoren für 4 min mit 200 µM [γ -³³P]ATP inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und deren Radioaktivität in einem Szintillationszähler gemessen. Die Menge an phosphoryliertem Protein wurde aus der spezifischen Radioaktivität der [γ -³³P]ATP-Lösung berechnet und zur eingesetzten Protein-Gesamtmenge ins Verhältnis gesetzt. Zur Berechnung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit wurde der prozentuale Anteil an phosphoryliertem Protein durch die Inkubationszeit mit [γ -³³P]ATP dividiert.

Die Geschwindigkeit der Autophosphorylierung von DcuS_{Ec} wurde um den Faktor 2 mit Succinat und 2,5-fach mit Fumarat gesteigert. Im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen (Janausch et al., 2002a) wurde eine Steigerung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit auch mit Malat (2-fach) und L-Tartrat (1,7-fach) beobachtet. Die Geschwindigkeit der Autophosphorylierung von DctS_{Gk} erreichte bereits in Abwesenheit von Effektoren einen ähnlichen Wert wie jene von DcuS_{Ec} mit Succinat (Abb. E27). Durch Zugabe von C₄-Dicarbonsäuren oder Citrat erfolgte keine weitere Steigerung. In Anwesenheit von Fumarat, Succinat oder Citrat war die Phosphorylierungsgeschwindigkeit sogar um den Faktor 2 reduziert.

G. kaustophilus verfügt wie *B. subtilis* über ein DctB-Bindeprotein, welches auf genetischer Ebene mit dem DctSR-System kolokalisiert ist (vgl. 4.2). In *B. subtilis* spielt DctB eine essentielle Rolle für das DctSR-System und fungiert vermutlich als Cosensor für DctS (Asai et al., 2000; diese Arbeit). Die direkte Interaktion von DctS_{Bs} mit DctB_{Bs} wurde durch drei unabhängige *in vivo* Interaktionsstudien gezeigt (vgl. 4.1.3). DctB aus *G. kaustophilus* könnte ebenso eine Cosensor-Rolle für DctS_{Gk} einnehmen. Daher wurde die *in vitro* Phosphorylierungsgeschwindigkeit von DctS_{Gk} nach Co-Rekonstitution mit DctB_{Gk} in Abhängigkeit von Effektoren getestet (Rudeck, 2011). Auch hier wurde keine C₄-Dicarboxylat-abhängige Steigerung der Autophosphorylierung beobachtet. Es erfolgte lediglich eine maximal 1,5-fache Effektor-unabhängige Steigerung der Phosphorylierung, wenn DctB_{Gk} zusätzlich zu DctS_{Gk} vorhanden war.

4.2.5 Komplementationsstudien mit DctS_{Gk} in *Bacillus subtilis*

DctS_{Gk} kann in *E. coli* heterolog exprimiert werden und zeigt Funktionskomplementation von DcuS_{Ec}. Dies wurde durch die DctS_{Gk} vermittelte Wiederherstellung der *dcuB*- bzw. *dctA*-Expression im DcuS_{Ec}-negativen Hintergrund gezeigt (vgl. 4.2.1). Die Stimulation des Reportergens *dcuB* bzw. *dctA* ist dabei teilweise unabhängig von Effektoren, was auf eine erhöhte Basalaktivität von DctS_{Gk} im heterologen System zurückzuführen ist. Diese kommt wahrscheinlich durch die veränderte Umgebung für das Protein während der Expression in einem gramnegativen Organismus zustande. Die Funktion von DctS_{Gk} kann nicht in *G. kaustophilus* selbst untersucht werden, da genetisches Arbeiten in diesem Organismus nicht etabliert ist. Für Funktionsuntersuchungen der Sensorkinase DctS_{Gk} unter möglichst nativen Bedingungen, wurde ein *in vivo* Testsystem in *B. subtilis* etabliert. *Bacillus* gehört wie die Gattung *Geobacillus* zur Familie der *Bacillaceae*. Diese sind grampositive, endosporenbildende und stäbchenförmige Bakterien. Das DctSR-System aus *G. kaustophilus* besitzt deutlich größere Ähnlichkeiten zu jenem aus *B. subtilis* als zu dem DcuSR-System aus *E. coli* (vgl. 4.2). Zur Untersuchung der DctS_{Gk} Funktion in *B. subtilis* wurde eine *dctS*-Insertionsmutante hergestellt, in welche zusätzlich eine *dctA-lacZ* Reporterfusion eingebracht wurde (Abb. E28).

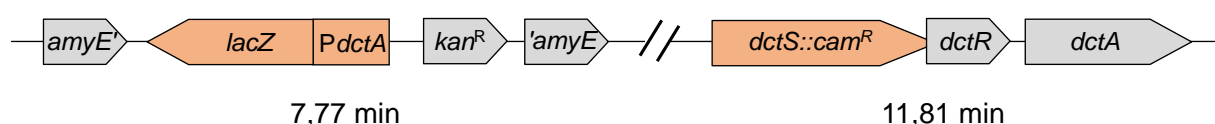


Abb. E28: **Genetischer Aufbau des *B. subtilis* 168 Stammes IMW598 mit ausgeschaltetem *dctS* und einer *dctA-lacZ* Reporterfusion.** *dctS* wurde mittels LFH (Long-Flanking-Homology)-PCR durch die Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzkassette ausgeschaltet. Der Promotorbereich von *dctA* wurde an ein *lacZ*-Gen fusioniert und in den *amyE*-Lokus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* integriert.

Die Inaktivierung von *dctS* erfolgte durch die Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzkassette mittels LFH (Long-Flanking-Homology)-PCR (Wach, 1996). Dabei wurde eine Chloramphenicol-Resistenzkassette konstruiert, welche von beiden Seiten mit Fragmenten komplementär zu Bereichen stromauf- bzw. stromabwärts von *dctS* flankiert ist (vgl. 3.3.3). Über diese flankierenden Bereiche kommt es nach Transformation des Resistenzgens in *B. subtilis* zur homologen Rekombination, sodass das Resistenzgen an die Stelle des *dctS*-Gens inseriert. Zur Herstellung einer translationalen *dctA-lacZ* Reporterfusion wurde zunächst der Intergenbereich vor *dctA* vor ein promotorloses *lacZ*-Gen in den Vektor pAC7 kloniert (vgl. 3.3.3). Die Klonierung erfolgte in *E. coli*. Nach Transformation des linearisierten Plasmids in *B. subtilis* kommt es zur homologen Rekombination der Reporterfusion über komplementäre Sequenzen zu dem *amyE*-Gen (Abb. E28). Die Selektion erfolgt über eine miteingebrachte Kanamycin-Resistenz. Das *amyE*-Gen kodiert für eine α -Amylase, welche die α -(1,4)-glykosidische Bindung der Amyloseeinheiten von Stärke spaltet. Die erfolgreiche Integration des Reportergens in den *amyE*-Lokus kann auch durch fehlende Stärkehydrolyse sichtbar gemacht werden.

Einfluss von DctS auf die Expression des Transporters DctA in *B. subtilis*

Um den Einfluss der *dctS*-Insertionsmutanten auf die Expression von *dctA* zu testen, wurde die *dctA-lacZ* Aktivität im DctS-negativen Hintergrund gemessen und mit jener des *B. subtilis* Wildtyps verglichen (Abb. E29). Im DctS-positiven Hintergrund zeigt *B. subtilis* Expression von *dctA-lacZ*, welche nach Zugabe von Fumarat um den Faktor 3 gesteigert wird. Im DctS-negativen Hintergrund hingegen wird die Expression von *dctA* nach Zugabe von Fumarat nicht weiter induziert. Hierdurch wird die Abhängigkeit der *dctA*-Expression von DctS in *B. subtilis* deutlich.

Es sollte zunächst untersucht werden, ob eine Komplementation der DctS-Funktion in *B. subtilis* mit plasmidkodierten DctS-Proteinen möglich ist. Dies wurde im DctS-negativen Hintergrund mit DctS_{Bs} getestet, welches in dem Vektor pHT304 exprimiert wurde. In diesem low-copy Vektor erfolgte die Expression von *dctS* mit eigenem Promotor. Die *dctA*-Expression war in diesem Stamm sowohl mit als auch ohne Fumaratzugabe stark reduziert, die Reportergenaktivität war geringer als in der DctS-Mutanten (Abb. E29). Da *dctS* in einem Operon mit *dctR* lokalisiert ist (Abb. E28), könnte bei Inaktivierung von *dctS* die Expression des Responseregulators DctR gestört sein. Daher wurde *dctS*_{Bs} gemeinsam mit *dctR*_{Bs} in den Vektor pHT304 kloniert. Die *dctA*-Expression mit plasmidkodiertem DctSR_{Bs} gleicht jener der DctS-Mutanten (Abb. E29). Der Stamm zeigt Expression von *dctA*, die durch Fumaratzugabe nicht weiter gesteigert wird.

Um eine mögliche Komplementation von DctS mit plasmidkodiertem DctS_{Gk} zu testen, wurde *dctS_{Gk}* in den Vektor pBQ200 kloniert. Dieser ist ein high-copy Plasmid, welches in *E. coli* und *B. subtilis* repliziert werden kann (Martin-Verstraete et al., 1994). Für die Expression in *B. subtilis* besitzt dieser den konstitutiven starken Promotor *degQ^h*. Die *dctA*-Expression zeigt mit plasmidkodiertem DctS_{Gk} eine hohe Aktivität, welche durch Zugabe von Fumarat um den Faktor 2,7 vermindert wird (Abb. E29). Möglicherweise sind die untypischen *dctA*-Expressionswerte ein Artefakt der Expression des Vektors pBQ200 in *B. subtilis*. Um dies zu klären, könnte die *dctA*-Expression in einem Stamm mit pBQ200 ohne *dctS_{Gk}* gemessen werden.

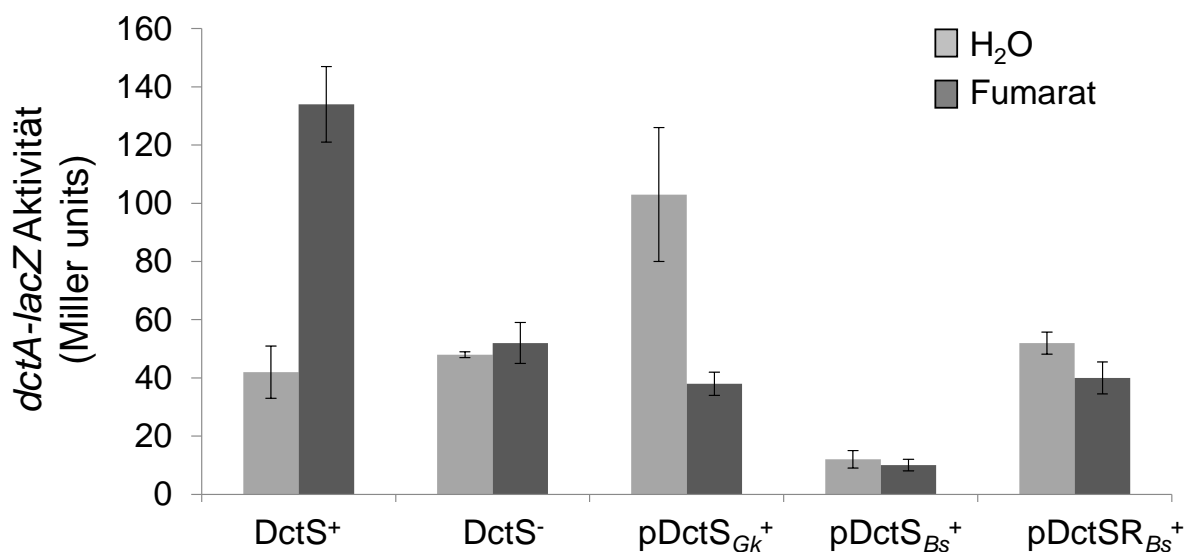


Abb. E29: ***dctA*-Expression der *B. subtilis* DctS-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und Komplementationsversuche mit DctS_{Gk} und DctS_{BS}.** Die Expression der *dctA-lacZ* Reporterfusion wurde bei einer OD von 1,3–1,6 in IMW597 (DctS⁺, *dctA-lacZ*), IMW598 (DctS⁻, *dctA-lacZ*) und in IMW598 mit plasmidkodiertem DctS_{Gk} (pMW1482) oder plasmidkodiertem DctS_{BS} (pMW1558) bzw. DctSR_{BS} (pMW1609) gemessen. Die Zucht erfolgte aerob in eWhite-Medium mit 20 mM Glycerin und mit oder ohne Zugabe von 30 mM Fumarat. Die Standardabweichung errechnete sich aus vier unabhängigen Zuchten in vier Parallelen.

Die Reporterogenaktivität in einem Stamm mit plasmidkodierten Varianten eines Proteins fällt meist geringer aus als mit dem chromosomal kodierten Protein. So ist in *E. coli* die Expression des Reportergens *dcuB-lacZ* in einem mit DcuS_{Ec} komplementierten Stamm deutlich geringer als im Wildtyp (Degreif-Dünnwald, 2011). Die *dctA*-Expression in *B. subtilis* ist bereits im Wildtyp verglichen mit anderen Reportergensystemen (vgl. Aktivität von *dcuB-lacZ* in *E. coli*) relativ gering. Dies könnte dazu führen, dass in einem Stamm mit plasmidkodiertem DctSR_{BS} oder DctSR_{Gk} die Expression von *dctA* zu gering ausfällt, sodass eine Komplementation der DctS-Funktion nicht mehr im messbaren Bereich liegt.

Einfluss von DctS auf das Fumaratwachstum von *B. subtilis*

Aerobes Wachstum mit Fumarat als C-Quelle wurde in *B. subtilis* 168 mit wildtypischem DctS sowie in der DctS-Insertionsmutanten untersucht. Im DctS-positiven Hintergrund zeigt *B. subtilis* im Minimalmedium mit 30 mM Fumarat gutes Wachstum und erreicht eine optische Dichte von 4,8 (Abb. E30). Das Wachstum von *B. subtilis* wird im DctS-negativen Hintergrund auch durch Fumarat stimuliert, erreicht jedoch eine etwas geringere optische Dichte von 3,7. Die Expression von *dctA* besitzt ohne Fumaratzugabe eine Basalaktivität. Diese reicht wahrscheinlich für Fumarat-stimuliertes Wachstum aus, jedoch wird das Wachstum nicht in der gleichen Intensität wie im DctS-positiven Hintergrund stimuliert.

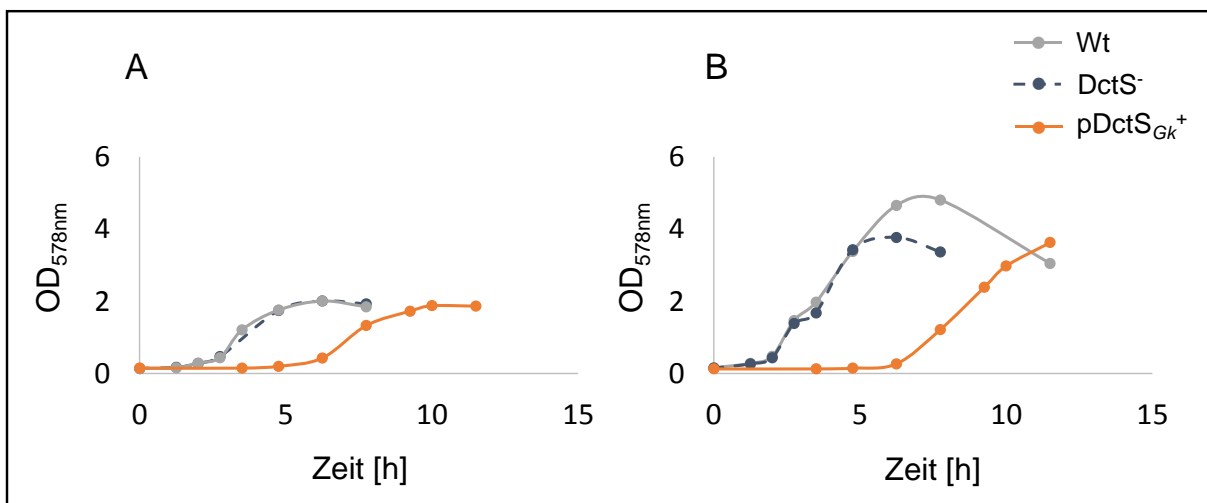


Abb. E30: **Aerobes Wachstum der *B. subtilis* DctS-Mutanten mit und ohne DctS_{Gk} in eWhite-Medium ohne C-Quelle (A) und mit 30 mM Fumarat (B).** Die DctS-Mutante IMW598 mit bzw. ohne plasmidkodiertem DctS_{Gk} (pMW1482) wurden in ihrem Wachstum mit dem DctS-Wildtypstamm IMW597 (DctS⁺, *dctA-lacZ*) verglichen. Für die Zellzucht wurde dem White-Medium 0,1% AHC, 0,01% L-Tryptophan und 0,1% Hefeextrakt zugesetzt.

Im DctS-negativen Hintergrund wurde mit plasmidkodiertem DctS_{Gk} ein auffälliges *dctA*-Expressionsmuster beobachtet. Die *dctA*-Expression war im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht und wurde durch Fumarat inhibiert. Das Wachstumsverhalten dieses Stammes zeigt ebenso Auffälligkeiten (Abb. E30). Dieser erreicht mit Fumarat eine ähnlich hohe optische Dichte wie die DctS-Mutante, die lag-Phase ist jedoch stark verlängert und beträgt 6 Stunden. Wie bereits erläutert sollte zur Überprüfung das Wachstum von *B. subtilis* mit dem Vektor pBQ200 ohne *dctS_{Gk}* gemessen werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob DctS_{Gk} in dem Vektor gebildet wird.

Konstruktion einer *B. subtilis* *dctB-lacZ* Reporterengenfusion

Wie durch Reporterengenmessungen gezeigt wurde, wird in *B. subtilis* die Fumarat-abhängige Expression des C₄-Dicarboxylat Transporters DctA durch das DctSR-Zweikomponentensystem kontrolliert. Für die Expression von DctA ist außerdem die Anwesenheit des Bindeproteins DctB notwendig (Asai et al., 2000). *In vivo* Interaktionsstudien zeigen die Interaktion von DctB mit der Sensorkinase DctS (vgl. 4.1.3). DctB spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle als Cosensor für DctS bei der Erkennung von C₄-Dicarbonsäuren. Das *dctB*-Gen ist direkt benachbart zu *dctSR* in umgekehrter Orientierung lokalisiert (Abb. E31). Es bildet ein Operon mit *ydbD*, welches für vermutlich für eine Mn-Katalase kodiert. Wahrscheinlich ist *dctB* ein weiteres Zielgen des DctSR-Systems. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde eine *dctB-lacZ* Reporterengenfusion in *B. subtilis* konstruiert (Abb. E31).

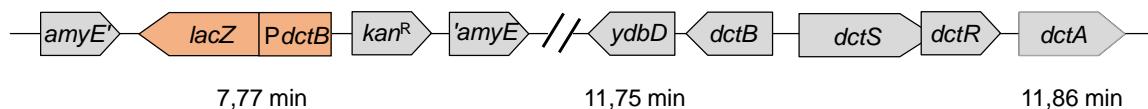


Abb. E31: **Genetischer Aufbau des *B. subtilis* 168 Stammes IMW599 mit einer *dctB-lacZ* Reporterengenfusion.** Der Promotorbereich von *dctB* wurde an ein *lacZ*-Gen fusioniert und in den *amyE*-Lokus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* integriert.

Die Konstruktion des *dctB-lacZ* Stammes IMW599 erfolgte analog zur Herstellung der *dctA-lacZ* Reporterengenfusion. Die komplette Intergenregion zwischen *dctS* und *dctB* (70 bp) wurde vor ein promotorloses *lacZ*-Gen in den Vektor pAC7 kloniert und die Fusion in *B. subtilis* 168 transformiert. Die Reporterengenaktivität der Fusion im Vektor pAC7 kann in *E. coli* durch Blau/Weiß-Screening überprüft werden. Bei Aktivität des Reportergens erfolgt auf X-Gal haltigen LB-Platten ein Farbumschlag des Indikatorfarbstoffs von weiß (keine Aktivität) nach blau (Aktivität). Zellen mit dem *dctB-lacZ* Fusionsvektor zeigten nur eine sehr schwache blaue Färbung. Für die Messung der Reporterengenaktivität in *B. subtilis* wurden die Zellen eWhite-Medium mit 20 mM Glycerin mit und ohne Zugabe von 30 mM Fumarat gezüchtet. Zur Bestimmung der Aktivität von *dctB-lacZ* wurden Zellen aus der exponentiellen (OD=0,5-0,8), post-exponentiellen (OD=1,3-1,5) und stationären (OD=3-4) Phase entnommen. In keiner der untersuchten Wachstumsphasen konnte eine Aktivität des *dctB-lacZ* Reportergens festgestellt werden. Auch nach Zucht des Stammes in LB-Medium war keine *dctB-lacZ* Expression messbar. Vermutlich ist die Expression des Reportergens zu schwach und liegt daher nicht im messbaren Bereich. Bei der Untersuchung von Reporterengen kann es dazu kommen, dass ins Chromosom integrierte Fusionen eine zu geringe Aktivität besitzen. Möglicherweise kann die *dctB*-Expression über eine plasmidkodierte Reporterengenfusion bestimmt werden. Eine andere Möglichkeit zur Untersuchung der Expression von *dctB* in Abhängigkeit des DctSR-

Systems wäre ein *in vitro* Ansatz. So könnte über EMSA (Electromobility Shift Assay) – Studien eine mögliche Bindung des DctR-Responseregulators an den *dctB*-Promotorbereich untersucht werden.

4.2.6 Expression und Reinigung weiterer Sensorkinasen mit Homologie zu DcuS_{Ec}

DcuS_{Ec} gehört zur CitA-Familie von Sensorhistidinkinasen. Sensoren dieser Familie bestehen aus zwei Transmembranhelices und einer dazwischenliegenden periplasmatischen Sensordomäne des PAS-Typs. Auf der cytoplasmatischen Seite schließt sich an die Transmembranhelix 2 eine weitere PAS-Domäne an, auf welche eine Kinasedomäne folgt.

Zweikomponentensysteme mit DcuS_{Ec}-ähnlichen Sensoren sind in mesophilen Bakterien weit verbreitet (Graf, 2009). Neben Vertretern der *Enterobacteriaceae* verfügen viele Bakterien aus der Familie der *Bacillaceae* über Sensoren der CitA-Familie. Vertreter der *Clostridiaceae* sowie einige *Pseudomonas*-Arten besitzen ebenso DcuS-ähnliche Sensoren. In thermophilen Bakterien sind bisher acht DcuS-ähnliche Sensorkinasen bekannt (Graf, 2009). Die Sensorkinasen sind auf genetischer Ebene jeweils mit einem zu DcuR homologen Protein kolokalisiert. Fünf dieser Sensorkinasen wurden in einem heterologen Expressionssystem in *E. coli* exprimiert und gereinigt (Tab. E4).

Zwei der Sensoren wurden funktionell in *E. coli* untersucht. Aus der Gattung *Geobacillus* sind vier DcuS-ähnliche Sensoren bekannt (Tab. E4). Diese Gattung gehört zur Familie der *Bacillaceae* und umfasst 11 Spezies. Die Bakterien sind stäbchenförmig, bilden Endosporen und leben unter aeroben oder fakultativ anaeroben Bedingungen (Nazina et al., 2001). *G. kaustophilus* verfügt über drei DcuS-ähnliche Sensoren. DctS_{Gk} gehört zur CitA-Familie von Sensorhistidinkinasen. Die Funktion von DctS_{Gk} wurde in *E. coli* durch Reporter gemessungen charakterisiert. Es zeigt Komplementation der DcuS_{Ec}-Funktion und besitzt Spezifität für die C₄-Dicarbonsäuren Fumarat, Malat und L-Tartrat sowie die C₆-Tricarbonsäure Citrat (vgl. 4.2.1). Die Kinaseaktivität von DctS_{Gk} wurde *in vitro* bestimmt (vgl. 4.2.4). Die Effektorbindestelle von DcuS_{Ec} ist in DctS_{Gk} mit Ausnahme der drei Phenylalaninreste F97, F120 und F149 konserviert.

Die zwei weiteren DcuS-ähnlichen Sensoren aus *G. kaustophilus* gehören nicht zur CitA-Familie. Die Topologie der beiden Sensoren ähnelt jener von DcuS, jedoch ließ die *in silico* Sekundärstrukturanalyse der Proteine auf das Vorhandensein einer HAMP-Domäne zwischen der Transmembranhelix 2 und der PASc-Domäne schließen (Tab. E4). Eine HAMP-Domäne umfasst bis zu 70 Aminosäuren und besteht aus zwei α -Helices. Sie ist Bestandteil der Domänenorganisation von Sensorhistidinkinasen anderer Familien, wie der Sensorkinase AtoS_{Ec}, die für die Erkennung von Acetoacetat verantwortlich ist. Die Effektorbindestelle von DcuS_{Ec} ist in beiden Sensoren nicht konserviert (Tab. E4). Die Sequenzidentität zu DcuS_{Ec}

beträgt nur 22 %. Die Sensoren besitzen jedoch eine hohe Sequenzidentität zu ResE bzw. PhoR aus *B. subtilis* (Tab. E4). Auf Grund der hohen Sequenzidentität wurden die Proteine als ResE_{Gk} bzw. PhoR_{Gk} bezeichnet. PhoR und ResE aus *B. subtilis* sind Sensorkinasen des PhoPR bzw. ResDE-Zweikomponentensystems. PhoPR und ResDE sind Teil des Pho-Regulons in *B. subtilis*, welches für die Regulation bei Nährstoffmangel, vor allem bei Phosphatmangel, verantwortlich ist (Hulett, 1996).

Tab. E4: *In silico* Analyse der gereinigten DcuS-ähnlichen Sensorkinasen aus thermophilen Bakterien.

Bakterium	Protein	Identität [%]	Domänenorganisation	TM	Fumaratbindestelle	Citratbindestelle
<i>G. kaustophilus</i>	DctS _{Gk}	33 zu DcuS _{Ec}	DcuS-Typ	2	8/11	6/11
<i>G. kaustophilus</i>	ResE _{Gk}	62 zu ResE _{Bs}	DcuS-Typ + HAMP	2	1/11	1/11
<i>G. kaustophilus</i>	PhoR _{Gk}	48 zu PhoR _{Bs}	DcuS-Typ + HAMP	2	1/11	1/11
<i>G. thermodenitrificans</i>	CitA _{Gt}	31 zu CitA _{Ec}	DcuS-Typ	2	7/11	9/11
<i>P. thermopropionicum</i>	DcuS _{Pt}	34 zu DcuS _{Ec}	DcuS-Typ	2	9/11	7/11

Die Domänenorganisation des DcuS-Typs sieht wie folgt aus: TM1-PAS_p-TM2-PAS_c-HK. Abkürzungen: Transmembranhelix (TM), periplasmatische PAS (Per-Arrnt-Sim)-Domäne (PAS_p), cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS_c), Kinasedomäne (HK), HAMP-Domäne (HAMP). Essentielle Aminosäurereste der Fumaratbindestelle in DcuS_{Ec}: F97, R107, H110, F120, K121, G140, F141, F149, L142, A143, R147 (Kneuper et al., 2005; Cheung und Hendrickson, 2008); essentielle Aminosäurereste der Citratbindestelle in CitA_{Kp}: Y99, T101, R109, H112, M122, G143, S144, L145, R150, K152, S167 (Reinelt et al., 2003; Sevvana et al., 2008). Die Tabelle gibt an, wie viele der jeweils 11 essentiellen Reste konserviert sind. Die Swiss-Prot-Einträge der untersuchten Proteine lauten wie folgt: CitA_{Gt}: A4IPE6; DctS_{Gk}: Q5L2L6; ResE_{Gk}: Q5KXM3, PhoR_{Gk}: Q5KWC0, DcuS_{Pt}: A5D2L2.

Ein weiterer Vertreter der Gattung *Geobacillus*, *G. thermodenitrificans*, verfügt über eine Sensorkinase, welche sich durch Sekundärstrukturanalyse der CitA-Familie zuordnen lässt (Tab. E4). Auf Grund der starken Konservierung der Citratbindestelle aus dem Citratsensor CitA von *Klebsiella pneumoniae* (CitA_{Kp}) wurde dieser Sensor als CitA_{Gt} bezeichnet. CitA_{Gt} kann die Funktion von CitA_{Ec} nach heterologer Expression in *E. coli* komplementieren (Parowatkin, 2012). In Anwesenheit von Citrat und Fumarat zeigt CitA_{Gt} auch Funktionskomplementation von DcuS in *E. coli*, der Sensor besitzt jedoch die höchste Spezifität für Citrat.

Ein mögliches DcuS_{Ec}-Homolog mit einer Sequenzidentität von 34 % wurde in dem strikt anaeroben Bakterium *Pelotomaculum thermopropionicum* identifiziert (Tab. E4). Dieses lebt im Klärschlamm bei 55 °C und kann neben syntropher Propionatoxidation auch Fumaratatmung betreiben (Imachi et al., 2002). Die Untersuchung der vorhergesagten Sekundärstruktur ergab, dass der Domänenaufbau dem der Sensoren der CitA-Familie gleicht. Der Vergleich der Effektorbindestelle zeigte eine größere Übereinstimmung zur

Fumaratbindestelle von DcuS_{EC} als zur Citratbindestelle von CitA_{Kp}. Daher wurde dieses Protein als DcuS_{Pt} bezeichnet. Transmembranhelix-Vorhersagen von DcuS_{Pt} zeigen je nach Vorhersageprogramm 2-4 potentielle Membranhelices an. Die Vorhersagen stimmen in der Berechnung zweier Transmembranhelices mit den beiden Helices von DcuS_{EC} überein. Mit drei Transmembranhelices wäre die Kinasedomäne des Sensors im Periplasma lokalisiert. Dies ist eher unwahrscheinlich. Die Lokalisation der vierten potentiellen Membranhelix befindet sich innerhalb der Kinasedomäne. Da Kinasedomänen von Sensoren hoch konserviert sind, ist die Existenz einer vierten Membranhelix an dieser Stelle ebenso unwahrscheinlich.

Für die heterologe Expression der DcuS-ähnlichen Proteine wurden die entsprechenden Gene aus dem Genom amplifiziert und in das Expressionsplasmid pET28a hinter einen induzierbaren T7-Promotor mit einem N-terminalen His₆-Anhang kloniert. Die rekombinanten Plasmide wurden in *E. coli* C43DE3 transformiert. Dabei handelt es sich um einen Expressionsstamm, der durch eine Spontanmutation aus *E. coli* BL21DE3 hervorgegangen ist und besonders geeignet für die Expression von Membranproteinen ist (Miroux und Walker, 1996). Die Proteine wurden in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen durch 3-stündige Induktion mit 1mM IPTG überproduziert. Nach Zellaufschluss wurde die Membranfraktion in 2 % Empigen solubilisiert. Die Isolation der Proteine erfolgte aus der Membranfraktion durch den N-terminalen His₆-Anhang mittels Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA Säule. Auf der Säule wurde das Detergenz gegen 0,04% LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid) ausgetauscht. Das Detergenz LDAO beugt der Bildung von Proteinaggregaten bei der Isolierung vor.

Nach Überproduktion von His₆-DctS_{Gk} wurden aus 0,8 l Zellkultur 10,5 mg des isolierten Proteins erhalten (Tab. E5). Dies entspricht einer Ausbeute von 1,8 % bezogen auf die Menge des Gesamtproteins.

Tab. E5: **Ausbeute an gereinigtem Protein nach heterologer Expression von DcuS-ähnlichen Sensoren aus thermophilen Bakterien.** His₆-DctS_{Gk} (pMW817), His₆-ResE_{Gk} (pMW973), His₆-PhoR_{Gk} (pMW972), His₆-CitA_{Gt} (pMW960) bzw. His₆-DcuS_{Pt} (pMW961) wurden jeweils in *E. coli* C43DE3 exprimiert. Die Zellzucht erfolgte in je 800 ml LB mit 100 mM Glucose.

Sensorkinase	Gesamtprotein* ¹ [mg]	Gereinigtes Protein* ² [mg]	Ausbeute an gereinigtem Protein* ³ [%]
His ₆ -DctS _{Gk}	590	10,5	1,8
His ₆ -ResE _{Gk}	610	1,8	0,3
His ₆ -PhoR _{Gk}	540	2	0,4
His ₆ -CitA _{Gt}	580	3	0,5
His ₆ -DcuS _{Pt}	630	2	0,3

*¹ Die Gesamtproteinmenge wurde mittels Bradford-Proteinbestimmung des Zellhomogenats nach Zellaufschluss bestimmt. *² Die Proteinmenge an gereinigtem Protein errechnete sich aus vier Elutionsfraktionen je 1 ml. *³ Die Ausbeute bezieht sich auf die Menge an gereinigtem Protein im Vergleich zum Gesamtprotein.

Von den weiteren vier Sensorkinasen wurden 2–3 mg Protein erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 0,3-0,5%.

Die gereinigten Sensorkinasen wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abb. E32). His₆-DctS_{Gk} und His₆-CitA_{Gt} besitzen eine Größe von 59 kDa und konnten mit hoher Reinheit isoliert werden. His₆-PhoR_{Gk} (66 kDa) zeigte nach Coomassie-Färbung ebenfalls wenig Verunreinigungen. Bei His₆-ResE_{Gk} (68 kDa) und His₆-DcuS_{Pt} (60,5 kDa) ist jeweils eine etwas stärkere Verunreinigung bei einer Größe von etwa 40 kDa zu erkennen. Diese Bande zeigt nach Isolation von DcuS_{Pt} sogar eine stärkere Färbung als jene bei der eigentlichen Größe des Proteins. Möglicherweise ist dies ein Abbauprodukt von DcuS_{Pt}.

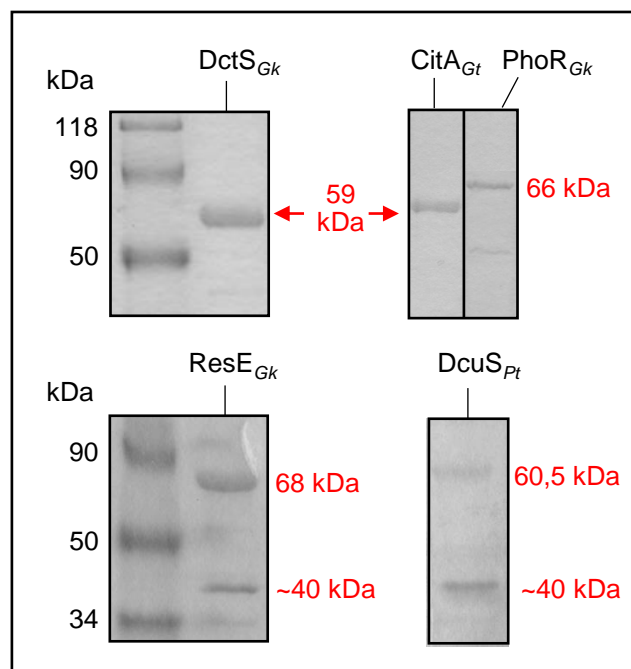


Abb. E32: **Expression und Reinigung von DcuS-ähnlichen Sensoren aus thermophilen Bakterien.** His₆-DctS_{Gk} (pMW817), His₆-CitA_{Gt} (pMW960), His₆-PhoR_{Gk} (pMW972), His₆-ResE_{Gk} (pMW973) bzw. His₆-DcuS_{Pt} (pMW961) wurden jeweils in *E. coli* C43DE3 exprimiert. Die isolierten Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

4.3 Interaktion zwischen Komponenten des DcuSR und CitAB-Systems in *E. coli*

DcuSR und CitAB sind paraloge Zweikomponentensysteme in *E. coli*. Die Sensoren DcuS und CitA gehören zur CitA-Familie von Sensorhistidinkinasen, welche einen sehr ähnlichen Aufbau in ihrer Topologie und Struktur besitzen. Das DcuSR-System kontrolliert die Expression der für die Fumaratatmung relevanten Gene (Zientz et al., 1998; Golby et al., 1999). Unter Anaerobiose induziert DcuSR in Abhängigkeit von C₄-Dicarbonsäuren und Citrat die Expression der Fumaratreduktase FrdABCD, des Fumarat/Succinat Antiporters DcuB sowie der Fumarase B. Die Erkennung von C₄-Dicarbonsäuren und Citrat erfolgt über die periplasmatische PAS-Domäne von DcuS mit einem apparenten K_d-Wert von 2-13 mM (Kneuper et al., 2005). Die Funktion von DcuS ist abhängig von der Interaktion mit dem Transporter DcuB, welcher der Sensorkinase als Cosensor dient (Kleefeld et al., 2009, Witan et al., 2012a, 2012b).

Das Zweikomponentensystem CitAB ist für die Kontrolle der für die Citratfermentation relevanten Gene verantwortlich (Kaspar und Bott, 2002; Yamamoto et al., 2008). Unter Anaerobiose und bei Anwesenheit von Citrat induziert CitAB die Expression des *citCDEFXGT* Genclusters sowie des *mdh*-Gens, welches für die Malatdehydrogenase kodiert (Yamamoto et al., 2008). Das *citCDEFXGT*-Gencluster kodiert für die Citratlyase sowie den anaeroben Citrat Transporter CitT. Die periplasmatische PAS-Domäne von CitA bindet den Effektor Citrat hochaffin mit einem apparenten K_d-Wert von 0,3 µM (Kaspar und Bott, 2002). Des Weiteren erkennt CitA Isocitrat und Tricarballoylat, jedoch keine C₄-Dicarbonsäuren. Im Gegensatz zu DcuS ist für die Funktion von CitA kein Cosensor notwendig (Scheu et al., 2012).

Die von DcuSR und CitAB regulierten Stoffwechselprozesse sind in *E. coli* eng miteinander verknüpft. Die Citratfermentation läuft in *E. coli* in Anwesenheit eines oxidierbaren Cosubstrates wie zum Beispiel Glucose, Glycerin oder Lactose ab (Lütgens und Gottschalk, 1980). Durch die Citratlyase wird Citrat in Acetat und Oxalacetat gespalten. Oxalacetat wird durch die Malatdehydrogenase zu Malat reduziert. Für die anschließende Umwandlung von Malat zu Fumarat und die Reduktion von Fumarat zu Succinat werden die Enzyme Fumarase B bzw. Fumaratreduktase benötigt. Die Expression dieser Enzyme wird durch das Zweikomponentensystem DcuSR reguliert. Durch die DcuSR-vermittelte Citraterkennung wird die Expression der Fumaratreduktase und Fumarase B gewährleistet.

***In vitro* Bindung von DcuR-P an den *citA*-Promotorbereich**

Neben der physiologischen Verknüpfung zeigt sich auch auf biochemischer und regulatorischer Ebene eine Korrelation zwischen den Zweikomponentensystemen DcuSR und CitAB. *In vivo* FRET- (Fluorescence resonance energy transfer) und BACTH-Messungen zeigen eine Interaktion zwischen den Sensorkinasen DcuS und CitA (Scheu et al., 2012). Im CitA-negativen Hintergrund kommt es bei Zugabe von Citrat zur Verringerung der DcuSR-abhängigen *dcuB*-Expression. Analog dazu zeigt sich im DcuS-negativen Hintergrund eine ähnlich starke Verringerung der CitAB-abhängigen *citC*-Expression in Anwesenheit von Citrat (Scheu et al., 2012). Für die beobachtete Reduktion der Genexpression bei Fehlen des jeweils paralogen Sensors wird die fehlende Interaktion zwischen den Sensoren DcuS und CitA verantwortlich gemacht.

Des Weiteren zeigt sich im DcuR-negativen Hintergrund eine 3,4-fache Reduktion der Citrat-abhängigen *citC*-Expression (Scheu et al., 2012). Eine direkte Bindung des Responseregulators DcuR an *citC* konnte durch Reportergergemessungen ausgeschlossen werden. Jedoch besitzt die Promotorregion von *citAB* mindestens zwei Sequenzmotive, die eine starke Konservierung zur Konsensussequenz der DcuR-Bindestelle zeigt (Scheu et al., 2012). Die Bindung von DcuR an den *citA*-Promotorbereich wurde *in vitro* durch EMSA (Electromobility shift assay)-Tests untersucht. Hierfür wurde zunächst His₆-DcuR in dem Expressionsvektor pET28a produziert und gereinigt. Da DcuR bei der Proteinreinigung zur Bildung von „inclusion bodies“ neigt und daher ein beträchtlicher Teil als unlösliches Protein verloren geht, wurde für die Reinigung von His₆-DcuR ein optimiertes Protokoll verwendet (Janausch et al., 2004). Dabei war es wichtig, dass während des Elutionsprozesses bei Ni²⁺-NTA Säulenreinigung die Konzentration der eluierten Proteinfraction 0,6 mg/ml nicht überschreitet. Dies wurde durch Elution des Proteins in 10 ml vorgelegten Puffer erreicht. Dadurch wurde das Protein direkt bei der Elution 1/10 verdünnt. Der Puffer enthielt 40 % Glycerin, was zu einer Stabilisierung von His₆-DcuR führte. Da das Protein dennoch nicht länger als 1 bis 2 Tage stabil blieb, wurden die EMSA-Tests mit frisch gereinigtem His₆-DcuR durchgeführt. Vor dem Test wurde His₆-DcuR durch Inkubation mit Acetylphosphat phosphoryliert. Die Promotorregion von *citA*, *dcuB* bzw. *dcuS* wurde mit His₆-DcuR inkubiert und anschließend mittels nativer DNA-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (Abb. E33). Nach Inkubation des *citA*-Promotors mit steigenden Konzentrationen an DcuR-P zeigte sich ein eindeutiger Mobilitätsshift des Promotorbereichs im nativen DNA-Gel. Die halbmaximale Konzentration von DcuR-P, welche für den Shift des *citA*-Promotors benötigt wird, lag bei 2–3 µM (Abb. E33). Die Promotorregion von *dcuB*, an welche DcuR-P nachweislich bindet (Abo-Amer et al., 2004, Janausch et al., 2004), zeigte ebenso einen Mobilitätsshift mit einer halbmaximalen DcuR-P Konzentration von 2–3 µM. Somit erfolgt eine ähnlich starke Bindung von DcuR-P an den *citA*-Promotorbereich wie an jenen von *dcuB*. Im

Gegensatz dazu wurde die Mobilität der *dcuS*-Promotorregion durch DcuR-P nicht verändert (Abb. E33). Dies ist in Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen, die zeigen, dass *dcuSR* nicht autoreguliert wird (Abo-Amer et al., 2004; Goh et al., 2005).

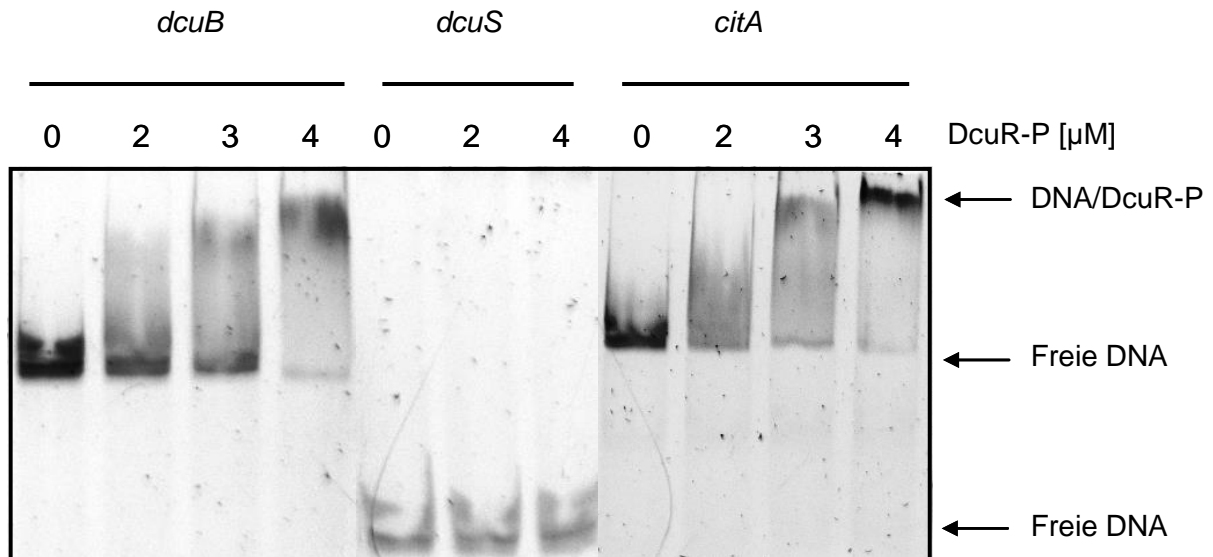


Abb. E33: Gel Retardation der *dcuB*, *dcuS* und *citA* Promoter-DNA durch phosphoryliertes DcuR (DcuR-P). Die Promotorbereiche von *citA* (652 bp), *dcuB* (603 bp) bzw. *dcuS* (220 bp) wurden bei 300-fachem Überschuss von Kompetitor-DNA mit steigenden Konzentrationen an His₆-DcuR-P inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der DNA/Protein-Fragmente mittels nativer DNA-Polyacrylamidgelelektrophorese (DNA-PAGE). Die Lokalisation der freien Promotor-DNA Fragmente und der geschifteten DNA/DcuR-P-Fragmente ist durch Pfeile markiert.

5 Diskussion

5.1 Bildung eines trimeren DctS/DctA/DctB-Komplexes für die Erkennung von C₄-Dicarbonsäuren in *Bacillus subtilis*

Das Zweikomponentensystem DctSR ist in *B. subtilis* für die Erkennung der C₄-Dicarbonsäuren Fumarat und Succinat verantwortlich und kontrolliert die Expression des aeroben C₄-Dicarboxylat-Transporters DctA (Asai et al., 2000) und vermutlich des Bindeproteins DctB. Genetische Mutationsanalysen zeigen, dass sowohl DctA als auch DctB die Funktionalität von DctSR beeinflussen (Asai et al., 2000). Eine Funktion von DctB als Cosensor für die Sensor kinase DctS wurde bereits vermutet. Die Interaktion von DctB mit der Sensor kinase DctS wurde in dieser Arbeit *in vivo* durch die drei unabhängigen Methoden mSPINE (Membrane Strep-Protein Interaction Experiment), mHPINE (Membrane His-Protein Interaction Experiment) und BACTH (Bacterial Two-Hybrid) gezeigt. Durch mSPINE und mHPINE Untersuchungen zeigte sich außerdem eine starke Interaktion des Transporters DctA mit dem Sensor DctS. Eine direkte Interaktion zwischen Transporter und Bindeprotein besteht nicht und der DctA-vermittelte Transport von [¹⁴C]-Succinat ist unabhängig von DctB. Nach Coexpression von DctA und DctB mit DctS interagieren in mSPINE-Tests Transporter und Bindeprotein gleichzeitig mit DctS. Dies zeigt die Anwesenheit von DctS/DctB- und DctS/DctA-Sensor/Regulator-Komplexen, die in *B. subtilis* gleichzeitig vorliegen und vermutlich eine heterotrimere DctS/DctA/DctB-Sensoreinheit bilden. Die Bezeichnung „Heterotrimer“ bezieht sich dabei auf die Existenz der drei unterschiedlichen Proteine in diesem Komplex und nicht auf den strukturellen Oligomerisierungsgrad des Proteinkomplexes. Im Folgenden wird ein Arbeitsmodell für die Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels durch den DctS/DctA/DctB-Komplex erläutert.

5.1.1 Rolle von DctA und DctB im DctS/DctA/DctB-Komplex in *B. subtilis*

Die Sensor kinase DctS bildet wahrscheinlich einen heterotrimeren Komplex mit dem Transporter DctA und dem Bindeprotein DctB (Abb. D1). In diesem Komplex spielt DctB vermutlich eine Rolle als primäre Bindestelle für Fumarat und Succinat und unterstützt die Sensor kinase DctS somit bei der Erkennung der C₄-Dicarbonsäuren. Für die Erkennung von C₄-Dicarbonsäuren spielt in DcuS aus *E. coli* (DcuS_{Ec}) die periplasmatische PASp-Domäne eine wichtige Rolle. Die für die Effektorbindung essentiellen Reste (Kneuper et al., 2005; Cheung und Hendrickson, 2008) sind in der PASp-Domäne von DctS aus *B. subtilis* (DctS_{Bs}) größtenteils konserviert (Abb. D2). Sieben der elf essentiellen Reste von DcuS_{Ec} sind in DctS_{Bs} identisch oder durch isofunktionelle Reste ausgetauscht. Möglicherweise besitzt die PASp-Domäne von DctS die Fähigkeit zur Effektorbindung, benötigt jedoch zur Erhöhung der

Spezifität und/oder Affinität für Fumarat und Succinat das Bindeprotein DctB. Die Ligandenbindung erfolgt bei Bindeproteinen typischerweise mit hoher Affinität, die K_D -Werte liegen meist im submikromolaren Bereich (Walmsley et al., 1992a; 1992b; Müller et al., 2006; Thomas et al., 2006; Rucktooa et al., 2007; Fischer et al., 2010; Mulligan et al., 2011). DcuS_{Ec} ist nicht assoziiert mit einem Bindeprotein, die Affinität für C₄-Dicarbonsäuren liegt im millimolaren Bereich und ist somit sehr niedrig. Es ist denkbar, dass DctB die geringe Affinität der Sensoren für C₄-Dicarbonsäuren steigert und daher eine sensorische Einheit mit der PASp-Domäne von DctS bildet (Abb. D1).

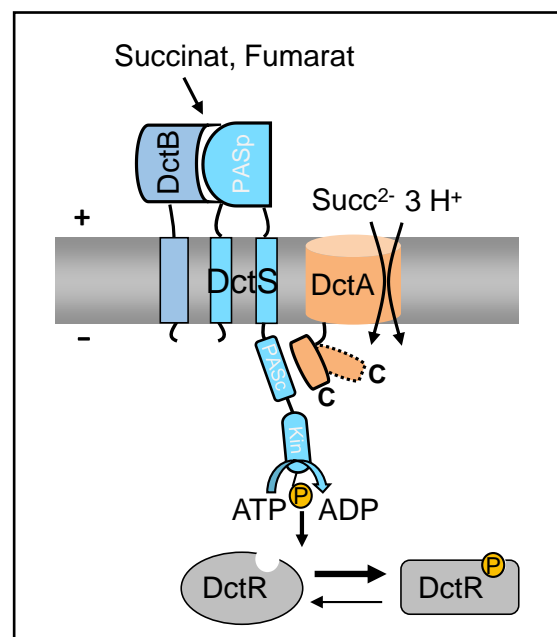


Abb. D1: **Modell für die Bildung eines funktionell heterotrimeren DctS/DctA/DctB-Komplexes in *B. subtilis* zur Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels.** Der Input des Stimulus erfolgt dabei an drei Stellen: DctB, PASp und DctA. Fumarat und Succinat werden von DctB erkannt und an die PASp-Domäne von DctS weitergereicht. DctS sorgt für die Weiterleitung des Signals in die Zelle und die Aktivierung des Responseregulators DctR. DctA interagiert vermutlich über die C-terminale Helix 8b mit der PASc-Domäne von DctS. Durch den Transport von Fumarat und Succinat wird diese Interaktion modifiziert (siehe abgeknickte C-terminale Helix 8b), wodurch DctS in einen aktiven Zustand gebracht wird. Die einzelnen Domänen der DctS-Sensorkinase sind in weißer Schrift gekennzeichnet: PASp, periplasmatische PAS (Per-Arnt-Sim)-Domäne; PASc, cytoplasmatische PAS-Domäne; Kin, Kinasedomäne.

Funktionale Interdependenz besteht auch zwischen dem Transporter DctA und DctS in *B. subtilis* (Asai et al., 2000). Im Zusammenhang mit der starken Interaktion von DctA und DctS in mSPINE und mHPINE Untersuchungen lässt dies auf eine Cosensor-Rolle von DctA schließen. Wahrscheinlich fungiert DctA aus *B. subtilis* in einer ähnlichen Weise wie DctA aus *E. coli* als Cosensor für die Sensorkinase (Abb. D1). Für die Interaktion mit DcuS_{Ec} ist die C-terminale Helix 8b in DctA_{Ec} verantwortlich (Witan et al., 2012a, 2012b). Die cytoplasmatische PASc-Domäne ist wahrscheinlich in DcuS_{Ec} für die Interaktion mit DctA_{Ec} zuständig. Bei Anwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren wird die Interaktion zwischen Transporter und Sensor modifiziert, sodass DcuS_{Ec} in einen aktiven Zustand gebracht wird.

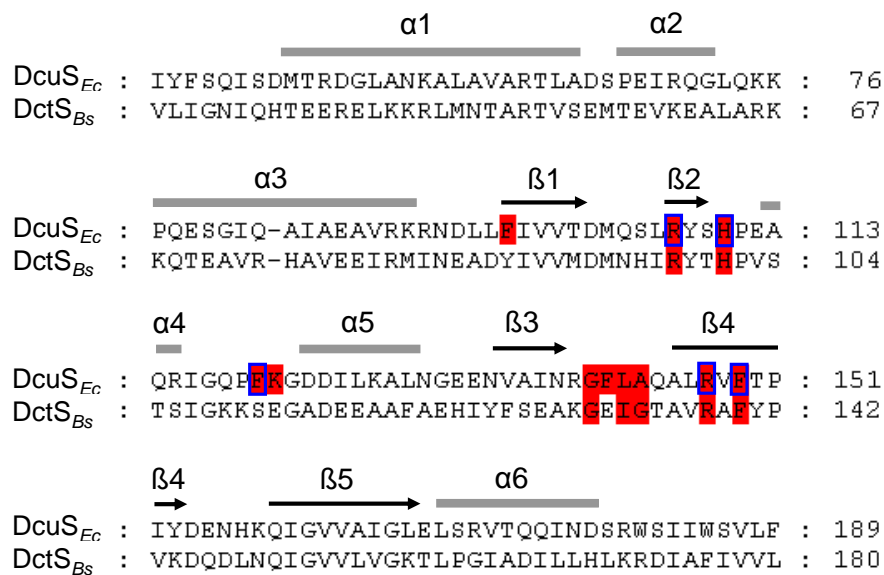


Abb. D2: **Konservierte Fumaratbindestelle in der PASp-Domäne von DctS aus *B. subtilis* (DctS_{Bs}).** Das Alignment zeigt die PASp-Domänen von DctS_{Bs} und DcuS_{Ec}. Die für die Fumaratbindung essentiellen Reste von DcuS_{Ec} sind rot markiert und wurden in der Kristallstruktur gelöst (F97, R107, H110, F120, K121, G140, F141, L142, A143, R147; Cheung and Hendrickson, 2008). Die blau umrandeten Reste wurden zusätzlich durch Mutationsanalyse identifiziert (R107, H110, F120, R147, F149; Kneuper et al., 2005). Eine Ausnahme bildet der Rest F149 in DcuS_{Ec}, welcher nur durch Mutationsanalysen, nicht aber durch Strukturanalysen als essentieller Rest identifiziert wurde (Scheu et al., 2010). Die Sekundärstrukturelemente der PASp-Domäne von DcuS_{Ec} sind oberhalb der Aminosäuresequenz als graue Balken (α -Helices) bzw. schwarze Pfeile (β -Faltblätter) dargestellt und wurden mittels PSIPRED (Jones, 1999) vorhergesagt. Mit Ausnahme des fehlenden $\beta 2$ -Faltblatts ist die vorhergesagte Sekundärstruktur der PASp-Domäne von DctS_{Bs} identisch zu DcuS_{Ec}.

Somit erfolgt eine Regulation des Aktivitätszustandes von DcuS_{Ec} durch die metabolische Transportrate von DctA_{Ec}. In der PASp-Domäne von DcuS_{Ec} kommt es daraufhin zur konzentrationsabhängigen Detektion der Effektoren und Signalweiterleitung in die Zelle. Die C-terminale Helix 8b ist spezifisch für Transporter des DctA-Typs und in strukturell ähnlichen Transportern wie etwa Glt_{Ph} aus *Pyrococcus horikoshii* nicht vorhanden (Witan et al., 2012a, 2012b). Die Helix 8b besitzt eine konservierte Signatursequenz LX₄LX₃L für die Interaktion mit DcuS_{Ec}. DctA aus *B. subtilis* verfügt auch über eine vorhergesagte Helix 8b, in welcher die Signatursequenz jedoch nur teilweise konserviert ist (Abb. D3). Möglicherweise interagiert DctA_{Bs} ebenso über die Helix 8b mit DctS, verwendet jedoch andere Aminosäurereste für die Interaktion. Die Interaktionsstelle von DctS könnte wie in DcuS_{Ec} die cytoplasmatische PASc-Domäne darstellen (Abb. D1).

Transportproteine oder auch extrazelluläre Bindeproteine fungieren in Zweikomponentensystemen häufig als Cosensoren (Tetsch und Jung, 2009; Buelow und Raivio, 2010). Meist kommt es zur Ausbildung von dimeren Sensor/Regulator-Einheiten wie zwischen DcuS und DctA in *E. coli*. Die Bildung eines trimeren DctS/A/B-Sensorkomplexes zur Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels in *B. subtilis* stellt eine weitere Variante eines Sensor/Regulator-Komplexes dar. Es ist denkbar, dass auch die DcuS/DctA-Sensoreinheit in

E. coli unter bestimmten Bedingungen um eine dritte Komponente erweitert wird. So beeinflusst die Inaktivierung des aeroben Transporters DauA (Dicarboxylic acid uptake system A) die Expression von *dctA* und hat somit möglicherweise eine regulatorische Funktion für das Zweikomponentensystem DcuSR (Karinou et al., 2013). DauA ist der aerobe Haupt-Transporter bei saurem pH-Wert für die C₄-Dicarbonsäuren Succinat, Fumarat und Aspartat.

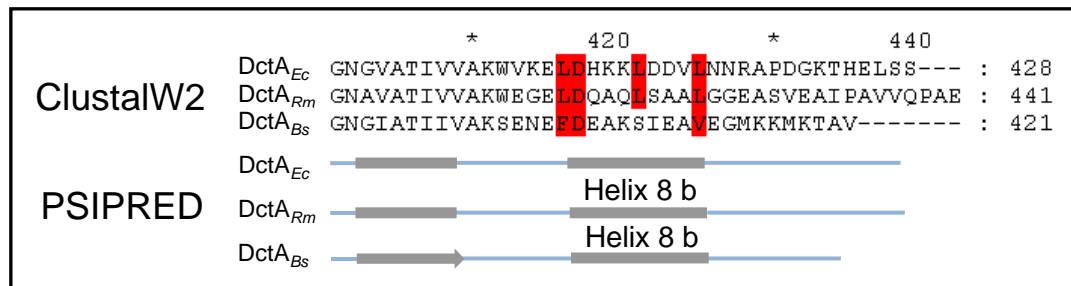


Abb. D3: Vergleich der C-terminalen Helix 8b der DctA-Transporter aus *Escherichia coli* (Ec), *Rhizobium meliloti* (Rm) und *Bacillus subtilis* (Bs). Die für die Interaktion mit DcuS_{Ec} essentiellen Aminosäurereste LDX₃LX₃L in DctA_{Ec} sind rot markiert. Die Sekundärstrukturen wurden mittels PSIPRED (Jones, 1999) vorhergesagt. α -Helices sind als graue Balken, β -Faltblätter als graue Pfeile dargestellt.

5.1.2 Ligandenbindung in DctP-Proteinen: Konservierte Bindetasche in DctB

Extrazelluläre Bindeproteine sind in ABC- und TRAP (Tripartite ATP-independent periplasmic)-Transportsystemen sowie als Cosensoren in Zweikomponentensystemen und bei MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Protein)-Proteinen bekannt. In ihrer Primärstruktur sind Bindeproteine wenig konserviert, die Sequenzidentität zwischen zwei Bindeproteinen beträgt durchschnittlich 20 % (Mulligan et al., 2011). Bindeproteine zeigen jedoch in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur einen hohen Konservierungsgrad und können auf Grund charakteristischer Unterschiede in ihrer Struktur in 6 verschiedene Cluster unterteilt werden (Berntsson et al., 2010). Die Bindeproteine des TRAP-Typs sind in einem Cluster zusammengefasst. TRAP-Bindeproteine bestehen wie alle bekannten Bindeproteine aus zwei globulären Domänen, die durch eine Scharnierregion miteinander verbunden sind. Die Ligandenbindung erfolgt in einer Spalte zwischen den beiden Domänen. Charakteristisch für TRAP-Bindeproteine ist eine lange α -Helix, welche beide Domänen durchspannt und als Scharnierregion dient. Außerdem werden beide Domänen von einem langen β -Faltblatt oder zwei aufeinanderfolgenden β -Faltblättern durchspannt (Berntsson et al. 2010; Abb. D4).

DctB aus *B. subtilis* gehört zu den TRAP-Bindeproteinen des DctP-Typs, welche Sequenzhomologie zu DctP aus *R. capsulatus* besitzen. Die Sequenzidentität zu DctP beträgt 37 %. Im Gegensatz zu DctP ist DctB_{Bs} nicht mit einem Transporter assoziiert, sondern interagiert als Cosensor mit der Sensorkinase DctS (vgl. 5.1.1). Die Tertiärstrukturvorhersage von DctB_{Bs} mittels Chimera ergab eine hohe Übereinstimmung zur Struktur des Bindeproteins

SiaP aus *Haemophilus influenzae* (Abb. D5). SiaP ist das erste strukturell untersuchte TRAP-Bindeprotein (Müller et al., 2006). Es gehört wie DctB_{BS} zu den DctP-Typ Bindeproteinen und ist Bestandteil des hochaffinen SiaPQM-Transporters zur Aufnahme von N-Acetylneuraminsäure (=Neu5Ac oder Sialinsäure) (Allen et al., 2005; Severi et al., 2005).

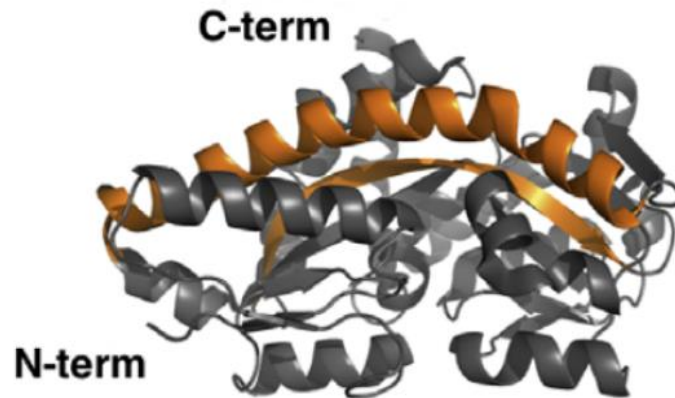


Abb. D4: **Charakteristische Tertiärstruktur von TRAP-Bindeproteinen.** Die Bindeproteine bestehen aus zwei globulären α/β -Domänen, die durch eine lange α -Helix sowie ein langes β -Faltblatt miteinander verbunden sind. Diese sind in orange hervorgehoben. Die Tertiärstruktur ist am Beispiel des Bindeproteins UehA (PDB code: 3FXB) aus *Ruegeria pomeroyi* dargestellt (Quelle: Berntsson et al., 2010).

Der SiaPQM-Transporter wurde gereinigt und in Liposomen rekonstituiert und zeigt Na⁺-abhängigen Transport von Sialinsäure (Mulligan et al., 2009). SiaP besteht aus zwei α/β -Domänen, die durch eine lange α -Helix (α_9) sowie zwei aufeinanderfolgenden β -Faltblättern (β_4 , β_5) miteinander verbunden sind (Müller et al., 2006; Abb. D5). Abgesehen von den fehlenden β -Faltblättern β_3 und β_{11} ist die vorhergesagte Tertiärstruktur von DctB_{BS} identisch zur Struktur von SiaP (Abb. D5; Abb. D6). Die Ligandenbindung in SiaP geht einher mit der Reorientierung der Domäne II um die als Scharnier dienende α -Helix 9 (Müller et al., 2006). Diese auch als „rigid body movement“ bezeichnete Bewegung führt zur Bildung der geschlossenen Konformation des Bindeproteins. Dieser Mechanismus wurde auch in anderen TRAP-Bindeproteinen beobachtet (Fischer et al., 2010). Die Bindung des Liganden erfolgt in SiaP durch die Bildung zweier Salzbrücken zwischen Argininresten (R147, R127) in Domäne II von SiaP und der Carboxylgruppe der Sialinsäure (Müller et al., 2006; Abb. D5). Die Aminosäure R127 ist in der Scharnierregion lokalisiert und spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Bewegung dieser Region (Müller et al., 2006). Die polare Interaktion zwischen N187 und der Carboxylgruppe verstärkt die Ligandenbindung (Abb. D5). Die Bildung der Salzbrücke zwischen R147 und der Carboxylgruppe des Liganden ist in Bindeproteinen des DctP-Typs hochkonserviert und ein essentieller Bestandteil der Ligandenbindung (Fischer et al., 2010). Auch in DctB_{BS} ist dieser Argininrest konserviert (Abb. D6; R188 in DctB_{BS}). Die Aminosäure R127 ist in DctB_{BS} durch einen isofunktionellen Lysinrest ausgetauscht (K167) und N187 ist

ebenfalls konserviert (N228 in DctB_{BS}). Daher erfolgt die Bindung von Fumarat und Succinat in DctB_{BS} vermutlich in ähnlicher Weise durch Interaktion mit der Carboxylgruppe des Liganden.

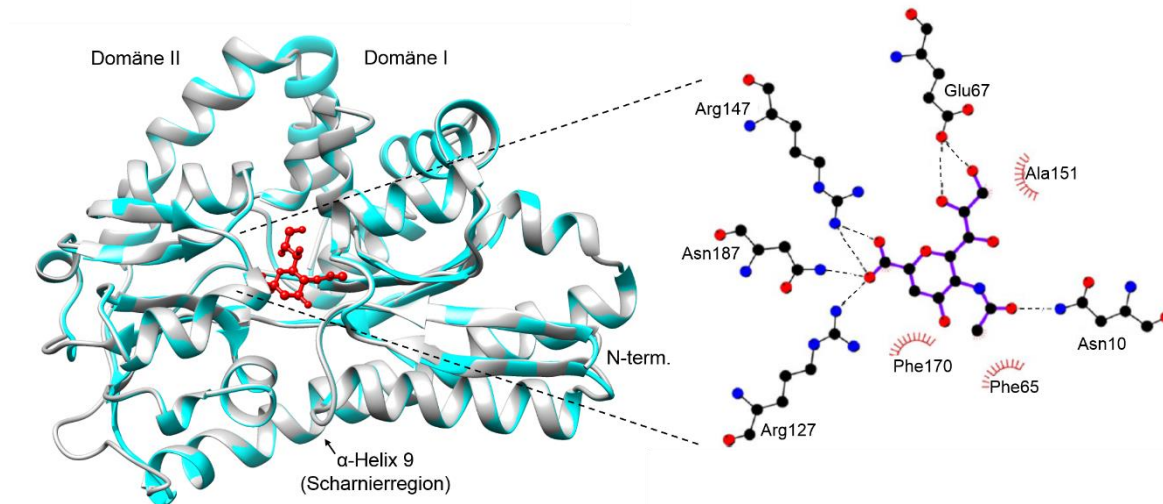


Abb. D5: **Vorhersage der Tertiärstruktur von DctB_{BS} auf Grundlage der Struktur von SiaP.** Die Tertiärstrukturen von DctB_{BS} und SiaP sind im linken Bild übereinander gelegt: grau, Struktur von SiaP (Müller et al., 2006); blau, vorhergesagte Struktur von DctB_{BS}. In der Bindetasche ist der Ligand von SiaP, N-Acetylneuraminsäure, dargestellt. Im rechten Bild ist die Interaktion der Aminosäuren aus SiaP mit dem Liganden dargestellt (Quelle: Müller et al., 2006).

Für die Bindung der Sialinsäure sind in SiaP weitere Aminosäuren wichtig, die mit anderen funktionellen Gruppen des Liganden interagieren. Diese sind wahrscheinlich spezifisch für die Bindung von Sialinsäure und in anderen Bindeproteinen weniger konserviert (Müller et al., 2006). Der Glycerinrest der Sialinsäure bildet Wasserstoffbrücken mit Q67 aus Domäne I, während die Carbonylgruppe einen Kontakt mit N10 bildet (Abb. D5). Des Weiteren kommt es zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen F170, F65 und A151 mit dem Liganden (Abb. D5). Die Aminosäure F170 spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Reorientierung der Domäne II nach Ligandenbindung (Müller et al., 2006). Bis auf F170 sind diese Reste in DctB_{BS} nicht konserviert (Abb. D6). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Natur des Liganden in DctB_{BS} abgesehen von der Carboxylgruppe verschieden ist zu jenem in SiaP.

Der Vergleich der vorhergesagten Sekundär- und Tertiärstruktur von DctB_{BS} mit der Struktur von SiaP zeigt große Übereinstimmungen der beiden Proteine (Abb. D5, D6). Der Mechanismus der Ligandenbindung sowie die Bindung des Liganden durch elektrostatische Interaktion mit der Carboxylgruppe erfolgen in DctB_{BS} wahrscheinlich analog zu SiaP.

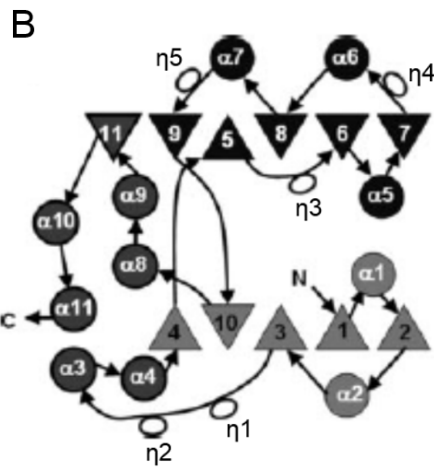
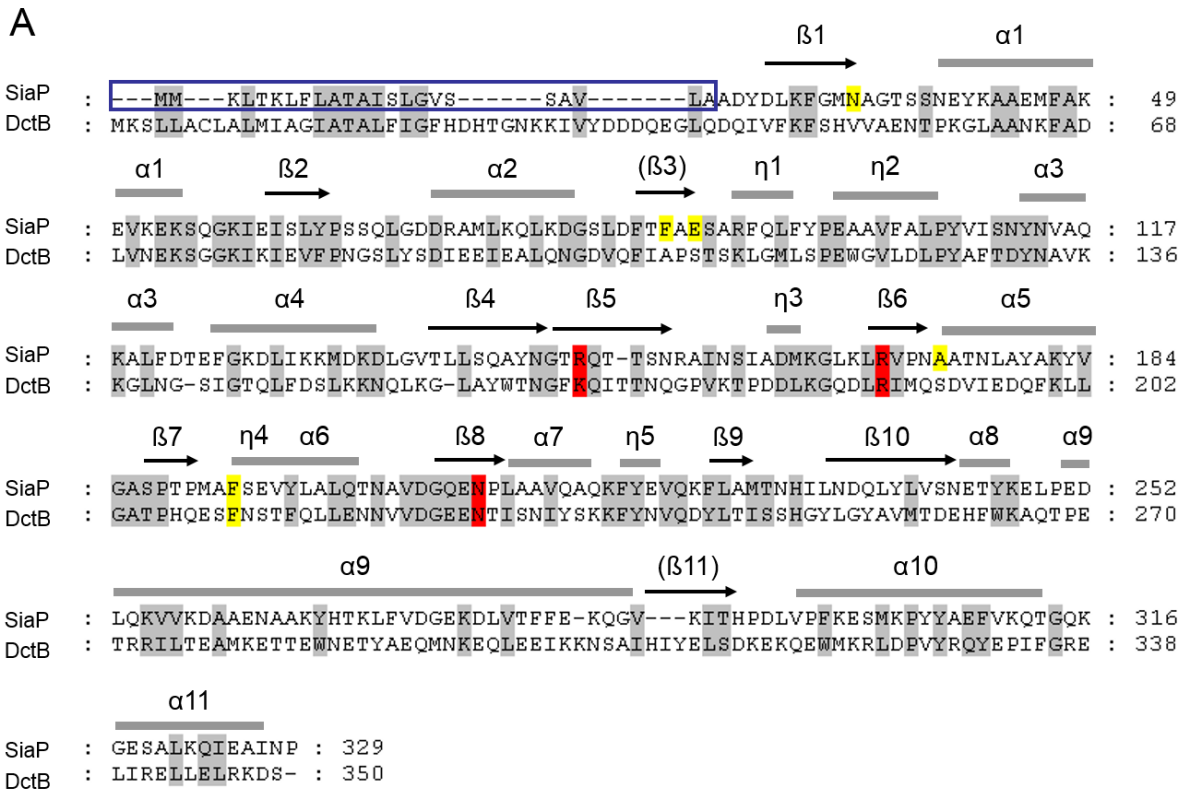


Abb. D6: **Vergleich der Primärsequenz und der Topologie von SiaP aus *Haemophilus influenzae* mit DctB_{Bs}.** (A) Sequenzähnlichkeiten gemäß ClustalW2 (Larkin et al., 2007) sind grau unterlegt; die Sequenzidentität der beiden Proteine beträgt 24,5 %. Die Aminosäurereste der Ligandenbindungstasche von SiaP sind rot bzw. gelb unterlegt: rot, mit der Carboxylgruppe von Sialinsäure interagierende Reste; gelb, Reste, die mit anderen funktionellen Gruppen der Sialinsäure interagieren. Die Sekundärstrukturelemente von SiaP basierend auf der Kristallstruktur des Proteins sind oberhalb des Sequenzalignments dargestellt. α -Helices sind als graue Balken, β -Faltblätter als Pfeile dargestellt; $\eta 1 - \eta 5$: kurze α -helicale Bereiche, die Verbindungen zwischen α -Helices und β -Faltblättern darstellen. Die Vorhersage der Sekundärstrukturelemente in DctB_{Bs} basiert auf der 3D-Strukturvorhersage, für welche die Struktur von SiaP als Grundlage dient. Mit Ausnahme der fehlenden β -Faltblätter $\beta 3$ und $\beta 11$ (in Klammern) sind die Sekundärstrukturelemente in DctB_{Bs} identisch zu SiaP. Die N-terminale Signalsequenz für den Export von SiaP ins Periplasma ist durch einen blauen Balken dargestellt. DctB_{Bs} besitzt in diesem Bereich vermutlich eine Transmembranhelix. (B) Schematisches Diagramm der Topologie von SiaP (Quelle: Müller et al., 2006): Die Sekundärstrukturelemente von Domäne I sind in grau, von Domäne II in schwarz dargestellt.

5.1.3 Mechanismus der Sensor / Bindeprotein-Interaktion am Beispiel von LuxPQ

Das Bindeprotein DctB aus *B. subtilis* interagiert mit der Sensorkinase DctS und spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle als Cosensor für die Erkennung von Fumarat und Succinat. DctB ist vermutlich die primäre Bindestelle für die C₄-Dicarbonsäuren (vgl. 5.1.1). Die Ligandenbindung erfolgt wahrscheinlich durch elektrostatische Interaktion mit jeweils einer der Carboxylgruppen von Fumarat bzw. Succinat. Hierbei spielt ein Arginin-Rest (N188 in DctB) eine essentielle Rolle, der in allen bisher bekannten TRAP-Bindeproteinen konserviert ist (vgl. 5.1.2).

Eine Cosensor-Rolle von Bindeproteinen ist auch in anderen Signaltransduktionssystemen verwirklicht (vgl. 2.3). Der Mechanismus der Interaktion zwischen Sensor und Bindeprotein ist im Lux-System von *Vibrio harveyi* gut untersucht (Neiditch et al., 2005, 2006). Das Lux-System spielt in *Vibrio harveyi* eine wichtige Rolle bei der Messung der Zelldichte zur interzellulären Kommunikation (Quorum sensing). Die interzelluläre Kommunikation erfolgt in Bakterien durch Pheromone, auch Autoinduktoren genannt, die konzentrationsabhängig von Signaltransduktionssystemen erkannt werden. Die Sensorkinase LuxQ aus *Vibrio harveyi* besitzt zwei aufeinanderfolgende periplasmatische PAS-Domänen und interagiert über diese in An- und Abwesenheit des Autoinduktors 2 mit dem Bindeprotein LuxP (Abb. D7).

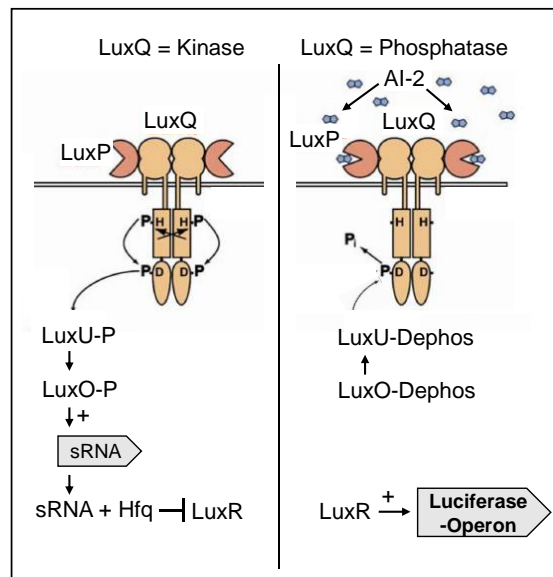


Abb. D7: **Erkennung des Quorum sensing Signalmoleküls Autoinduktor 2 durch LuxPQ in *Vibrio harveyi*.** Bei niedriger Zelldichte und somit geringer Konzentration von Autoinduktor 2 führt die Kinaseaktivität von LuxQ zu einer Phosphorylierungskaskade, durch welche der Transkriptionsfaktor LuxO die Expression von regulatorischen RNA-Produkten (sRNA) induziert (linkes Bild). Im Zusammenwirken mit dem Chaperon Hfq inhibieren diese die Transkription des Regulators LuxR. Bei hoher Zelldichte und somit höherer Konzentration an Autoinduktor 2 detektiert das Bindeprotein LuxP das Signalmolekül, wodurch sich die Konformation des LuxPQ-Komplexes verändert (rechtes Bild). Dies führt zu einer hohen Phosphataseaktivität von LuxQ, wodurch der Regulator LuxR gebildet werden kann. LuxR induziert als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die für die interzelluläre Kommunikation wichtig sind. Abkürzungen: AI2, Autoinduktor 2; P, Phosphorylgruppe; Dephos, dephosphoryliertes Protein (Abb. verändert nach Neiditch et al., 2006).

Periplasmatische PAS-Domänen (PASp) sind in vielen Sensorkinasen ausreichend für die Reizdetektion. LuxQ hingegen benötigt für die Reizerkennung das Bindeprotein LuxP. Die Bindung von Autoinduktor 2 an LuxP löst eine Konformationsänderung der LuxQ/LuxP-Interaktion aus. Dies führt zur Abschaltung der Kinaseaktivität von LuxQ und zur Stimulierung der Phosphataseaktivität des Proteins. Somit kann der Transkriptionsfaktor LuxR gebildet werden und durch diesen die Expression von Genen induziert werden, die für die interzelluläre Kommunikation wichtig sind (Abb. D7).

Die Sensorkinase LuxQ liegt in dimerer Form vor (Neiditch et al., 2006). LuxP liegt in monomerer Form vor und besteht aus zwei Domänen. Die Ligandenbindung erfolgt in einer Spalte zwischen den beiden Domänen (Chen et al., 2002), wie es für periplasmatische Bindeproteine üblich ist. In Abwesenheit von Autoinduktor 2 interagiert LuxP über je eine Domäne mit je einer PASp-Domäne eines LuxQ-Monomers (Neiditch et al., 2005). Die Bindung des Liganden induziert die Dimerisierung der periplasmatischen Domänen (Neiditch et al., 2006; Abb. D8A). Durch die Ligandenbindung erfolgt die für Bindeproteine typische „rigid body“ Bewegung, durch welche eine zweite LuxQ-Interaktionsstelle in LuxP freier wird (Abb. D8B). Dadurch wird ein asymmetrisches $(\text{LuxPQp})_2$ -Dimer gebildet (Abb. D8A). Die Bildung des asymmetrischen Dimers spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion in die Zelle (Neiditch et al., 2006).

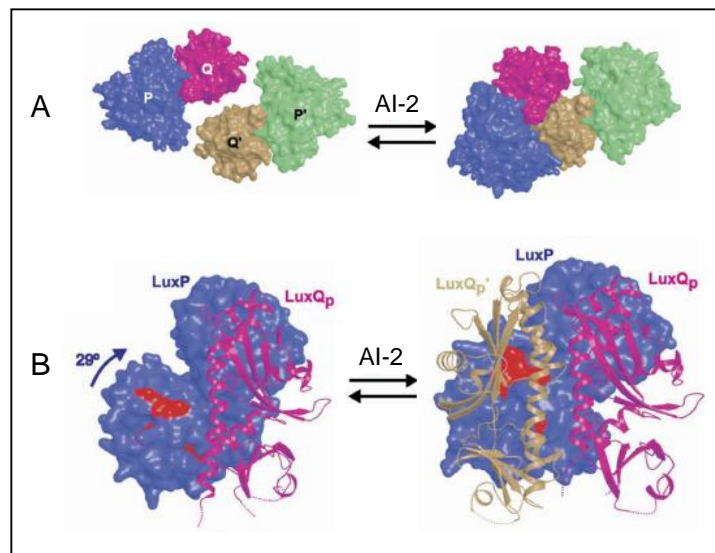


Abb. D8: **Bildung des asymmetrischen $(\text{LuxPQp})_2$ -Komplexes nach Ligandenbindung in LuxP.** (A) Sicht auf die periplasmatischen PAS-Domänen eines LuxQ-Dimers (Q bzw. Q') im Komplex mit dem Bindeprotein LuxP (P bzw. P'). Nach Bindung von Autoinduktor 2 (AI-2) durch LuxP erfolgt die Bildung eines asymmetrischen $(\text{LuxPQp})_2$ -Dimers im Periplasma. (B) Sicht auf ein LuxP-Monomer im Komplex mit den zwei PAS-Domänen eines LuxQ-Monomers (LuxQp). Durch die Ligandenbindung kommt es zur Bewegung einer der Domänen von LuxP, wodurch eine zweite LuxQ-Interaktionsstelle freier wird. Die in rot dargestellte Region in LuxP spielt eine essentielle Rolle bei der Interaktion mit dem zweiten LuxQ-Monomer (Quelle: Neiditch et al., 2006).

Der Mechanismus der Sensor/Bindeprotein-Interaktion zwischen DctS aus *B. subtilis* und dem Bindeprotein DctB ist bisher nicht geklärt. Im LuxPQ-System von *V. harveyi* ist das Bindeprotein LuxP alleine für die Ligandenbindung verantwortlich, der Ligand wird offensichtlich nicht an die Sensorkinase LuxQ weitergegeben. Dies könnte auch für die DctS/DctB-Interaktion gelten, DctB könnte alleine die C₄-Dicarbonsäuren binden und durch die Interaktion mit DctS das Signal an die Sensorkinase weiterleiten. Da DctS eine konservierte Fumaratbindestelle besitzt (vgl. 5.1.1), ist jedoch auch eine Substratweitergabe von DctB an DctS denkbar. In diesem Fall wäre DctB die primäre Bindestelle für Fumarat und Succinat und würde die Affinität von DctS für die C₄-Dicarbonsäuren erhöhen.

DctB interagiert möglicherweise in An- und Abwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren mit DctS. Die Ligandenbindung könnte zu einer Konformationsänderung des DctS/DctB-Komplexes führen, welche für die Signalweiterleitung wichtig sein könnte. Ebenso ist es denkbar, dass eine Interaktion zwischen DctS und DctB nur in Anwesenheit der C₄-Dicarbonsäuren erfolgt. Nach Ligandenbindung durch DctB könnte eine Stelle für die Interaktion mit DctS freiwerden, wodurch die Aktivität von DctS moduliert werden kann.

5.1.4 DctP-Bindeproteine mit potentieller Cosensor-Funktion

Bindeproteine des DctP-Typs sind häufig essentieller Bestandteil eines hochaffinen TRAP-Transportsystems zur Aufnahme von Substraten in die Zelle (vgl. 2.3; Mulligan et al., 2011). Beispiele hierfür sind DctP zur Erkennung von C₄-Dicarbonsäuren aus *R. capsulatus* und das Sialinsäure-Bindeprotein SiaP aus *H. influenzae* (Forward et al., 1997; Allen et al., 2005; Severi et al., 2005). DctB aus *B. subtilis* ist im Gegensatz zu den klassischen DctP-Bindeproteinen nicht mit einem DctQM-Transportsystem assoziiert. DctB interagiert *in vivo* mit der Sensorkinase DctS und spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle als Cosensor für die Erkennung von Fumarat und Succinat (vgl. 4.1.3). Ein Modell für die Cosensor-Rolle von DctB im DctSR-Zweikomponentensystem von *B. subtilis* wurde bereits erläutert (vgl. 5.1.1). Das für das Bindeprotein kodierende *dctB*-Gen ist im Chromosom von *B. subtilis* in direkter Nachbarschaft zu *dctSR* lokalisiert (Abb. D9). *dctB* bildet ein Operon mit *ydbD* (Asai et al., 2000), welches für eine potentielle Mangan-Katalase (Mn-Katalase) kodiert. YdbD besitzt 50,2 %ige Sequenzidentität zur Mn-Katalase aus *Lactobacillus plantarum*. Diese gehört zur Gruppe der TypII-Katalasen, die Mangan im aktiven Zentrum besitzen und bei mikroaerophilen Bakterien häufig vorkommen (Barynin et al., 2001). Der Grund für die Kollokalisierung von *dctB* mit *ydbD* ist bisher nicht bekannt.

Auch in anderen Bakterien sind Bindeproteine des DctP-Typs zu finden, die im genetischen Kontext mit einem zu DctSR homologen Zweikomponentensystem assoziiert sind (Abb. D9). Diese scheinen nicht mit den DctQM-Einheiten eines TRAP-Transporters verknüpft zu sein.

Geobacillus kaustophilus verfügt über ein Bindeprotein, welches 46 %ige Sequenzidentität zu DctB aus *B. subtilis* besitzt und als DctB_{GK} bezeichnet wird. *dctB_{GK}* bildet wahrscheinlich ein Operon mit *dctA*, welches für einen potentiellen C₄-Dicarboxylat Transporter kodiert. Direkt benachbart in umgekehrter Orientierung ist ein DctSR-Zweikomponentensystem lokalisiert. Eine solche Genanordnung ist auch in dem aeroben, mesophilen Bakterium *Lysinibacillus sphaericus* vorhanden (Abb. D9).

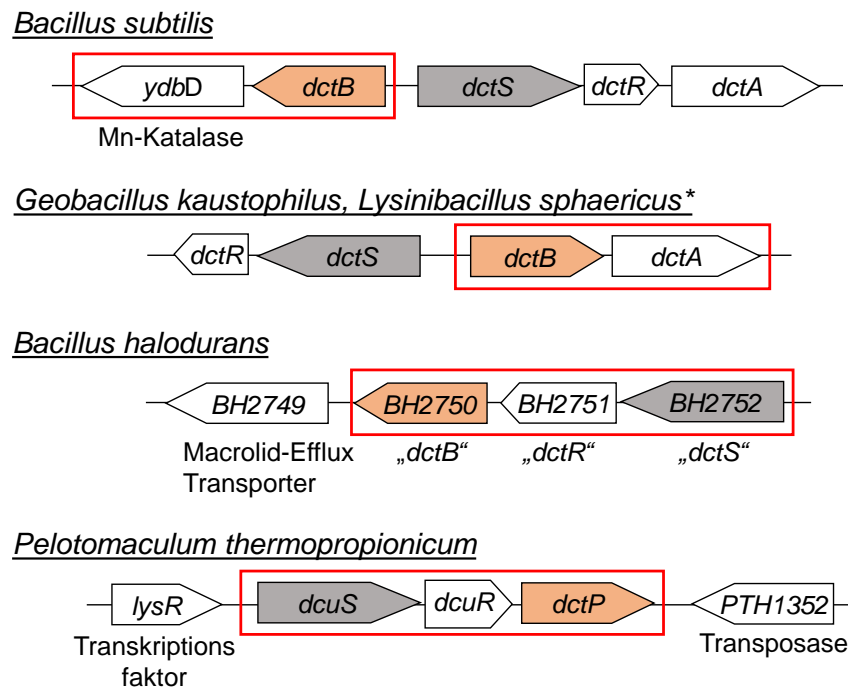


Abb. D9: **Genetischer Kontext von mit Zweikomponentensystemen assoziierten Bindeproteinen des DctP-Typs.** Die kodierenden Gene für Sensorkinasen und Bindeproteine sind grau bzw. orange hervorgehoben und zeigen auf Proteinebene Homologien zueinander. Die direkte genetische Nachbarschaft der Bindeproteine ist durch rote Rechtecke hervorgehoben. Die Gene sind nach der Annotation in der Datenbank ExpASY entweder mit einer Nummer oder mit dem Namen bezeichnet. *Die Lage und Bezeichnung der Gene beziehen sich auf das Genom von *G. kaustophilus*. Die entsprechenden Gene werden in *L. sphaericus* wie folgt bezeichnet: Bsph3687 (DctS-Homolog), Bsph 3686 (DcuR-Homolog), Bsph3688 (DctB-Homolog), Bsph3689 (DctA-Homolog).

Die Sensorkinase DctS_{GK} zeigt Homologie zu DctS_{BS} und DcuS aus *E. coli* und kann nach heterologer Expression in *E. coli* die Funktion von DcuS übernehmen (vgl. 4.2). Die Rolle von DctB_{GK} ist noch unklar. Dieses könnte wie DctB aus *B. subtilis* eine Cosensor-Rolle für die Sensorkinase DctS_{GK} übernehmen. Auf Grund der möglichen Cotranskription von *dctB* mit *dctA* könnte DctB_{GK} jedoch auch eine wichtige Rolle für den DctA-vermittelten Transport von C₄-Dicarboxylaten spielen.

Bacillus halodurans besitzt sechs vollständige TRAP-Transportsysteme bestehend aus einem Bindeprotein des DctP-Typs und den Membrankomponenten DctQ und DctM (Kelly und Thomas, 2001). Außerdem verfügt *B. halodurans* über ein DctP-Bindeprotein, welches im

genetischen Kontext mit einem Zweikomponentensystem kolokalisiert ist (Abb. D9). Es liegt direkt benachbart zu einem Sensor/Regulator-Paar und wird möglicherweise mit diesem cotranskribiert. Die Sensorkinase zeigt mit einer Sequenzidentität von 43 % Homologie zu DctS_{Bs} und wird daher als DctS_{Bh} bezeichnet. Das Bindeprotein besitzt 39 %ige Sequenzidentität zu DctB aus *B. subtilis*. Es ist denkbar, dass dieses ähnlich wie in *B. subtilis* als Cosensor für DctS_{Bh} fungiert. Benachbart zu *dctSRB* liegt in *B. halodurans* ein Gen, welches für einen potentiellen Makrolid-Efflux Transporter kodiert. Makrolide sind von Bakterien oder Pilzen produzierte Antibiotika, welche die 50S-Untereinheit der bakteriellen 70S-Ribosomen angreifen. Effluxtransporter können Bakterien zur Resistenz gegenüber des Antibiotikums dienen.

Eine Genanordnung wie in *B. halodurans* ist auch in dem strikt anaeroben Bakterium *Pelotomaculum thermopropionicum* zu finden (Abb. D9). Das Bindeprotein DctP besitzt Sequenzhomologie zu DctB aus *B. subtilis* und wird wahrscheinlich mit Genen für ein *dcuSR* Sensor/Regulator-Paar cotranskribiert. *P. thermopropionicum* kann neben syntropher Propionatoxidation auch Fumaratatmung betreiben (Imachi et al., 2002). Die Fumaratbindestelle von DcuS aus *E. coli* ist in DcuS aus *P. thermopropionicum* (DcuS_{Pt}) konserviert (vgl. 4.2.6). Möglicherweise benötigt DcuS_{Pt} dennoch zur hochaffinen Erkennung von Fumarat ein Bindeprotein des DctP-Typs als Cosensor.

5.2 Stoffwechselregulation in Thermophilen: Sensoren der CitA-Familie

Bakterien sind häufig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt und daher wird ihr Energiestoffwechsel in Anpassung an äußere Faktoren reguliert. Je nach Verfügbarkeit können Bakterien eine Vielzahl an Kohlenstoffquellen nutzen. Da sich die Energieausbeute verschiedener Kohlenstoffquellen unterscheidet, wird deren Verwendung hierarchisch reguliert. Die hierarchische Nutzung der Energiesubstrate wird meist durch transkriptionelle Repression der Aufnahmesysteme alternativer Substrate bewerkstelligt (Katabolitrepression, vgl. 2.1). Glucose ist in vielen Bakterien wie etwa *E. coli* und *B. subtilis* bevorzugtes Energiesubstrat. Die C₄-Dicarbonsäure Malat ist in *B. subtilis* neben Glucose eine weitere bevorzugte Kohlenstoffquelle (Kleijn et al., 2010). Im Gegensatz zu *E. coli* kann *B. subtilis* unter aeroben Bedingungen mit Citrat als C-Quelle wachsen. In *Pseudomonas aeruginosa* sind die C₄-Dicarbonsäuren Fumarat, Malat und Succinat bevorzugte Energiesubstrate und die Nutzung dieser Substrate wird gegenüber Glucose präferiert (Liu, 1952; Montie, 1998). Die Regulation des C₄-Dicarboxylat- und Citratstoffwechsels erfolgt in vielen Bakterien durch Zweikomponentensysteme bestehend aus einer Sensorkinase des CitA-Typs und einem Responseregulator (Scheu et al., 2010). Sensorkinasen des CitA-Typs besitzen den gleichen topologischen Aufbau wie der Citratsensor CitA aus *E. coli* (CitA_{Ec}) und *Klebsiella pneumoniae*

(CitA_{Kp}). CitA_{Ec} bzw. CitA_{Kp} dienen der anaeroben Detektion von Citrat und zur nachfolgenden Induktion der für die Citratfermentation relevanten Gene. Sensoren der CitA-Familie sind mit zwei Transmembranhelices in der Membran verankert, die durch eine periplasmatische PAS-Domäne (PASp) getrennt sind. Im Cytoplasma befinden sich eine weitere PAS-Domäne (PASc) und eine Kinasedomäne. Die Sensorkinase ist für die Erkennung des Substrats und die Signalweiterleitung in die Zelle verantwortlich, während der Responseregulator meist als Transkriptionsfaktor die Expression der entsprechenden Zielgene induziert. In *E. coli* erfolgt die Regulation des C₄-Dicarbonsäurestoffwechsels durch das Zweikomponentensystem DcuSR (Zientz et al., 1998; Golby et al., 1999; vgl. 2.2). Die Regulation des C₄-Dicarbonsäurestoffwechsels wird in *B. subtilis* durch die Zweikomponentensysteme DctSR und MalKR bewerkstelligt (Asai et al., 2000; Doan et al., 2003; Tanaka et al., 2003; vgl. 2.2). Die aerobe Citratverwertung wird in *B. subtilis* durch das Zweikomponentensystem CitST reguliert (Yamamoto et al., 2000).

Sensoren der CitA-Familie sind auch in thermophilen Bakterien zu finden (Graf, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sensorkinase DctS aus dem thermophilen Bakterium *Geobacillus kaustophilus* näher charakterisiert. Des Weiteren wurde im Rahmen einer Diplomarbeit die Substratspezifität der Sensorkinase CitA aus *Geobacillus thermodenitrificans* bestimmt (Parowatkin, 2012). Beide Sensorkinasen sind auf genetischer Ebene jeweils mit einem Responseregulator in einem Operon angeordnet. Im Folgenden werden die Zweikomponentensysteme der thermophilen Vertreter erläutert und mit den homologen Systemen aus *E. coli* und *B. subtilis* verglichen.

5.2.1 Das DctSR-System aus *Geobacillus kaustophilus*

Geobacillus kaustophilus ist ein thermophiler Vertreter aus der Familie der *Bacillaceae*. Dieser kann in verschiedenen Habitaten wie zum Beispiel im Boden, in Ölfeldern oder pasteurisierter Milch leben (White et al., 1993). Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 55°C bis 65°C (Nazina et al., 2001). *G. kaustophilus* kann C₄-Dicarbonsäuren als Energiesubstrat verwenden und zeigt auf Fumarat, Malat, Succinat und Aspartat besseres Wachstum als auf verwandten Säuren wie zum Beispiel Butyrat (Graf, 2009). Zur Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels in *G. kaustophilus* wurde ein DctSR Zweikomponentensystem identifiziert. Die Sensorkinase DctS_{Gk} gehört wie DctS_{Bs} und DcuS_{Ec} zur CitA-Familie von Sensorhistidinkinasen. DctS_{Gk} wurde in *E. coli* heterolog exprimiert und gereinigt. Das Protein besitzt eine für Sensorkinasen typische Kinasedomäne und verfügt über einen konservierten Histidinrest (H335), an welchem wahrscheinlich die Autophosphorylierung stattfindet (vgl. 4.2.4). In *E. coli* Phospholipide rekonstituiertes DctS_{Gk} zeigt Autokinase-Aktivität nach Zugabe von [γ -³³P]-ATP. Verglichen mit DcuS_{Ec} besitzt DctS_{Gk} mit einem K_D-Wert für [γ -³³P]-ATP von

43 μM eine 10-fach höhere Affinität für ATP. Der Anteil an phosphoryliertem DctS_{Gk} war mit 18 % im Vergleich zur *in vitro* Phosphorylierung von DcuS_{Ec} etwa 10-fach höher. Wahrscheinlich ist DctS_{Gk} *in vitro* stabiler als DcuS_{Ec} und der Anteil an funktionalem Protein ist demzufolge höher. Ebenso ist denkbar, dass aus energetischen Gründen ein höherer Anteil des His-Restes in DctS_{Gk} durch ATP phosphorylierbar ist. Die Geschwindigkeit der *in vitro* Autophosphorylierung von DctS_{Gk} wurde durch C₄-Dicarbonsäuren nicht beeinflusst (vgl. 4.2.4). Möglicherweise ist DctS_{Gk} für die Erkennung der C₄-Dicarbonsäuren auf die Funktion des Bindeproteins DctB angewiesen. Dieses besitzt 46 %ige Sequenzidentität zu DctB aus *B. subtilis* und könnte ähnlich wie DctB_{Bs} als Cosensor fungieren. Nach Corekonstitution von DctS_{Gk} mit DctB_{Gk} wurde jedoch keine C₄-Dicarboxylat-abhängige Steigerung der Autophosphorylierung beobachtet (Rudeck, 2011).

Nach heterologer Expression in *E. coli* zeigt DctS_{Gk} Funktionskomplementation von DcuS_{Ec}. Dies wurde *in vivo* durch die Wiederherstellung der anaeroben *dcuB-lacZ* bzw. der aeroben *dctA-lacZ* Reporterexpression im DcuS_{Ec}-negativen Hintergrund gezeigt (vgl. 4.2.1). Im Unterschied zu DcuS aus *E. coli* stimuliert DctS_{Gk} bereits ohne Zugabe von Effektoren die Expression von *dcuB*. Diese Basalaktivität wird durch die Zugabe der C₄-Dicarbonsäuren Malat, Fumarat, L-Tartrat sowie der C₆-Tricarbonsäure Citrat um den Faktor 2-3 gesteigert. Im aeroben *dctA*-Expressionssystem wurde ebenso eine Basalaktivität von DctS_{Gk} beobachtet. Zusätzlich zu Fumarat und Malat zeigt DctS_{Gk} unter aeroben Bedingungen auch Spezifität für Succinat.

Die unspezifische Induktion der Reporterexpression durch DctS_{Gk} könnte verschiedene Ursachen haben, zum Beispiel eine teilweise mangelnde Spezifität der Interaktion von DctS_{Gk} mit dem Responseregulator DcuR in *E. coli*. Eine fehlende oder störende Wechselwirkung mit anderen Komponenten der *E. coli* Zelle oder eine nicht völlig native Konformation von DctS_{Gk} in *E. coli* könnten weitere Ursachen für die unspezifische Basalaktivität sein. So könnte die Temperatur, bei welcher die Komplementationsexperimente in *E. coli* durchgeführt wurden, die Konformation oder Funktion von DctS_{Gk} beeinflussen. Die Experimente wurden bei 37°C durchgeführt, DctS_{Gk} stammt aber aus einem thermophilen Organismus mit einer Wachstumstemperatur von 55°C-65°C.

Die Erkennung der C₄-Dicarbonsäuren durch DctS_{Gk} erfolgt vermutlich durch die periplasmatische PAS-Domäne (PASp) wie bei DcuS aus *E. coli*. Die für die Ligandenbindung essentiellen Reste von DcuS_{Ec} sind in der PASp-Domäne von DctS_{Gk} größtenteils konserviert (vgl. 4.2.2). Einzel- und Doppelmутanten der konservierten Reste R97, H100, R137 und F139 von DctS_{Gk} zeigten im heterologen Expressionssystem gegenüber wildtypischem DctS_{Gk} keine signifikante Änderung der anaeroben *dcuB*-Expression. Der Austausch der entsprechenden Reste R107, H110, R147 bzw. F149 in DcuS_{Ec} führt hingegen zum völligen Verlust der Fumaratinduktion von *dcuB-lacZ* (Kneuper et al., 2005). Die Seitenketten von R107, H110 und

R147 in DcuS_{Ec} sind an der Bildung von Wasserstoffbrücken zu dem gebundenen Malat beteiligt (Cheung und Hendrickson, 2008). Möglicherweise können in den DctS_{Gk} Einzel- und Doppelmutanten andere Aminosäurereste die Bildung der Wasserstoffbrücken übernehmen oder die Bindung durch die noch verbleibenden Reste reicht für die Fumaraterkennung aus.

Auf Grundlage der *in vivo* und *in vitro* Charakterisierung der Sensor kinase DctS_{Gk} wird für die DctSR-vermittelte Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels in *G. kaustophilus* folgende Regulation vorgeschlagen (Abb. D10).

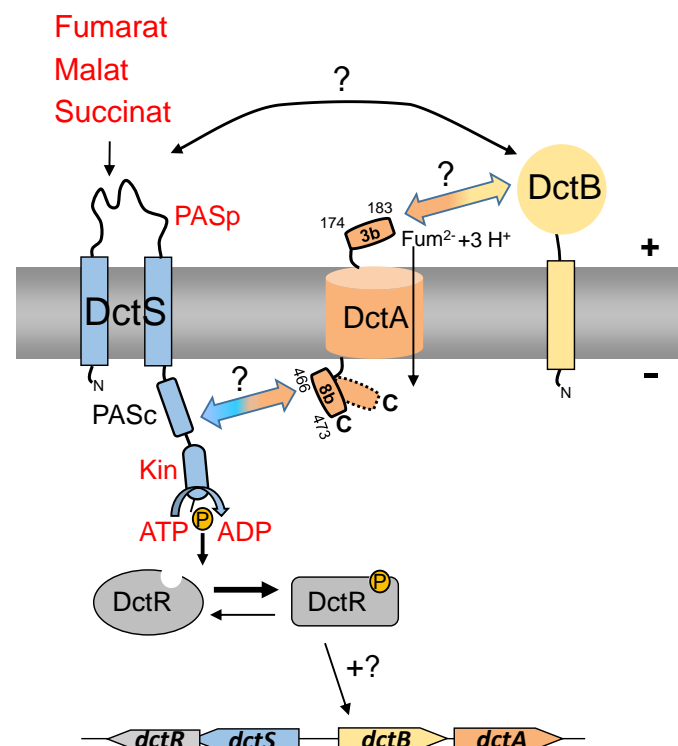


Abb. D10: **Modell der Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels durch das DctSR-Zweikomponentensystem in *Geobacillus kaustophilus*.** In rot gezeichnete Signaltransduktionswege sind experimentell bestätigt. Die Position der vorhergesagten Helix 3b bzw. Helix 8b in DctA_{Gk} ist durch die Aminosäureposition in Ziffern oberhalb bzw. unterhalb der jeweiligen Helix angegeben. Doppelpfeile zwischen den einzelnen Proteinen markieren eine potentielle Interaktion zwischen den Proteinen.

Citrat ist im heterologen Expressionssystem ein Induktor für DctS_{Gk}, jedoch kein Wachstumssubstrat für *G. kaustophilus* (vgl. 4.2.1). Eine Rolle von Citrat im DctSR-Zweikomponentensystem ist jedoch nicht auszuschließen, da Citrat-abhängiges Wachstum in *G. kaustophilus* möglich sein sollte (White et al., 1993). Die C₄-Dicarbonsäuren Fumarat, Malat und Succinat sind sowohl Induktoren für DctS_{Gk} als auch gute Wachstumssubstrate für *G. kaustophilus*. Nach Erkennung der C₄-Dicarbonsäuren durch die PASp-Domäne von DctS_{Gk} wird das Signal in die Zelle weitergeleitet und es erfolgt eine Autophosphorylierung der Sensor kinase und die Phosphorylierung und Aktivierung des Responseregulators DctR (Abb. D10). DctA_{Gk} ist wahrscheinlich wie in *B. subtilis* und *E. coli* für den protonengekoppelten

Symport der C₄-Dicarbonsäuren verantwortlich. Die cytoplasmatische Helix 8b von DctA aus *E. coli* zur Interaktion mit DcuS ist auch in DctA_{Gk} vorhanden und könnte als Interaktionsdomäne dienen (Abb. D10). Das Bindeprotein DctB_{Gk} könnte ähnlich wie in *B. subtilis* als Cosensor für DctS_{Gk} dienen und mit der PASp-Domäne der Sensorkinase interagieren. Auf Grund der möglichen Cotranskription von *dctB* mit *dctA* könnte DctB_{Gk} jedoch auch eine Rolle für den DctA_{Gk}-vermittelten Transport spielen. In diesem Fall wäre eine Interaktion von DctB_{Gk} mit DctA_{Gk} über die periplasmatische Helix 3b des Transporters denkbar. Diese Helix ist spezifisch für DctA-Transporter (Witan et al., 2012a, 2012b) und auch in DctA_{Gk} vorhanden (Abb. D10). Die Funktion der Helix 3b in DctA-Transportern ist unbekannt.

Das DctSR-System aus *G. kaustophilus* ist somit ein weiteres Beispiel für ein Zweikomponentensystem zur Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels. Es zeigt Homologie zu DcuSR aus *E. coli* sowie DctSR aus *B. subtilis* und ist für seine Funktion möglicherweise von anderen Komponenten wie dem Transporter DctA und/oder dem Bindeprotein DctB abhängig.

5.2.2 Das CitAB-System aus *Geobacillus thermodenitrificans*

Geobacillus thermodenitrificans ist ein weiterer thermophiler Vertreter aus der Familie der *Bacillaceae*. Dieser ist ein typischer Bodenbewohner und wächst bis zu einer Temperatur von 70°C (White et al., 1993). *G. thermodenitrificans* kann auch in Ölfeldern leben und mit Rohöl als einziger Kohlenstoffquelle wachsen (Wang et al., 2006). Durch Genom- und Proteomanalysen wurden die Gene und Genprodukte für die zentralen Stoffwechselwege der Glykolyse, des Citratzyklus sowie der β -Oxidation identifiziert (Feng et al., 2007).

G. thermodenitrificans verfügt über eine Sensorkinase, die laut Sekundärstrukturvorhersagen eine typische Domänenorganisation der Sensoren des CitA-Typs besitzt (vgl. 4.2.6). Auf Grund der Ähnlichkeit zur Citratbindestelle des Citratsensors CitA von *Klebsiella pneumoniae* (CitA_{Kp}) wurde dieser Sensor als CitA_{Gt} bezeichnet. Die Effektorbindestelle von CitA_{Kp} ist in CitA_{Gt} mit Ausnahme des Threonin-Restes T101 konserviert (Abb. D11). Die Struktur der PASp-Domäne von CitA_{Kp} wurde durch Röntgenkristallographie mit sowie ohne gebundenem Citrat bestimmt (Reinelt et al., 2003; Sevvana et al., 2008). Der apparente K_D-Wert für Citrat von CitA_{Kp} liegt bei 5,5 μ M (Gerharz et al., 2003). CitA_{Ec} bindet Citrat ähnlich affin mit einem K_D-Wert von 0,15-1 μ M (Kaspar und Bott, 2002).

PASp

CitA _{Gt}	: AT	LKE	Q	I	G	M	R	A	L	N	V	A	E	T	V	A	S	T	P	L	V	R	E	A	F	R	D	S	N	P	S	V	R	L	Q	P	F	A	E	R	I	R	Q	K	T	: 79			
CitA _{Kp}	: ER	L	H	Y	Q	V	G	Q	R	A	L	I	Q	A	M	Q	I	S	A	M	P	E	L	V	E	A	V	Q	K	R	-	D	L	A	R	I	K	A	L	I	D	P	M	R	S	F	S	: 95	
CitA _{Ec}	: D	Y	L	T	L	H	V	R	D	M	A	M	N	Q	A	K	I	I	A	S	N	D	S	V	I	S	A	V	K	T	R	-	D	Y	K	R	L	A	T	I	A	N	K	L	Q	R	D	T	: 93

CitA _{Gt}	: GA	E	V	V	I	G	N	R	Q	G	I	R	Y	A	H	P	L	T	E	R	I	G	K	S	I	G	G	D	N	-	K	E	V	L	K	G	K	S	I	I	S	E	A	V	C	: 126		
CitA _{Kp}	: DA	T	Y	I	T	V	G	D	A	S	G	Q	R	L	Y	H	V	N	P	D	E	I	G	K	S	M	E	G	G	D	S	D	E	A	L	I	N	A	K	S	Y	V	S	V	R	K	G	: 143
CitA _{Ec}	: D	F	D	V	V	I	G	D	R	H	S	I	R	L	Y	H	P	N	P	E	K	I	G	Y	P	M	Q	F	T	K	-	Q	G	A	L	E	K	G	E	S	Y	F	I	T	G	K	G	: 140

CitA _{Gt}	: S	I	G	P	A	I	R	G	K	A	P	I	F	D	E	N	G	S	V	I	G	I	V	S	V	G	F	L	L	E	D	I	Q	R	T	V	W	S	Y	--	S	M	K	I	F	F	F	: 172	
CitA _{Kp}	: S	I	G	S	S	L	R	G	K	S	P	I	Q	D	A	T	G	K	V	I	G	I	V	S	V	G	Y	T	I	E	Q	L	E	N	W	L	S	L	Q	I	S	S	L	L	I	P	M	A	: 191
CitA _{Ec}	: S	M	G	M	A	M	R	A	K	T	P	I	F	D	D	D	G	K	V	I	G	V	S	I	G	Y	L	V	S	K	I	D	S	W	R	A	E	F	L	L	P	M	A	G	V	F	V	: 188	

Abb. D11: **Konservierte Citratbindestelle in den PASp-Domänen von CitA aus *E. coli* und CitA aus *G. thermodenitrificans*.** Das Alignment zeigt die PASp-Domänen von CitA aus *Klebsiella pneumoniae* (CitA_{Kp}), CitA aus *E. coli* (CitA_{Ec}) und CitA aus *G. thermodenitrificans* (CitA_{Gt}). Die für die Citratbindung essentiellen Reste von CitA_{Kp} sowie die konservierten Reste in CitA_{Ec} und CitA_{Gt} sind rot markiert und wurden in der Kristallstruktur von CitA_{Kp} gelöst (Y99, T101, R109, H112, M122, G143, S144, L145, R150, K152, S167; Reinelt et al., 2003; Sevana et al., 2008).

Die Sensor kinase CitA_{Gt} wurde *in vivo* charakterisiert (Parowatkin, 2012). Nach heterologer Expression in *E. coli* komplementiert CitA_{Gt} die Funktion einer CitA_{Ec}-Insertionsmutanten (Abb. D12A). Das Zweikomponentensystem CitAB ist in *E. coli* verantwortlich für die anaerobe Erkennung von Citrat und nachfolgende Induktion der für die Citratfermentation relevanten Gene (Scheu et al., 2012). Der Funktionszustand von CitA_{Ec} kann über die Aktivität des Reportergens *citC-lacZ* gemessen werden. *citC* kodiert für eine Untereinheit der Citratlyase in *E. coli*, welche für die Spaltung von Citrat verantwortlich ist. Im CitA_{Ec}-negativen Hintergrund erfolgt keine Induktion der *citC-lacZ* Expression (Abb. D12A). Durch plasmidkodiertes CitA_{Ec} wird die Citrat-abhängige *citC-lacZ* Expression wiederhergestellt. Wird CitA_{Gt} plasmidkodiert in *E. coli* exprimiert, erfolgt ebenso eine Komplementation der *citC*-Expression (Abb. D12A). Im Gegensatz zu CitA aus *E. coli* stimuliert CitA_{Gt} bereits ohne Zugabe von Effektoren die Expression von *citC*. Diese Basalaktivität wird durch die Zugabe von Citrat um den Faktor 2 gesteigert, während Fumarat, Succinat und Malat keine Steigerung, sondern eine Hemmung der *citC*-Expression verursachen.

CitA_{Gt} zeigt auch Funktionskomplementation von DcuS in *E. coli* (Parowatkin, 2012). Im DcuS-negativen Hintergrund ist mit plasmidkodiertem CitA_{Gt} eine Basalaktivität der *dcuB-lacZ* Reportergenexpression zu beobachten. Diese kann mit Citrat um den Faktor 2,5 und mit Fumarat um den Faktor 1,5 gesteigert werden (Abb. D12B). Somit besitzt CitA_{Gt} höchste Spezifität für die C₆-Tricarbonsäure Citrat und ist auf Grund der *in vivo* Analysen als ein Citratsensor einzustufen.

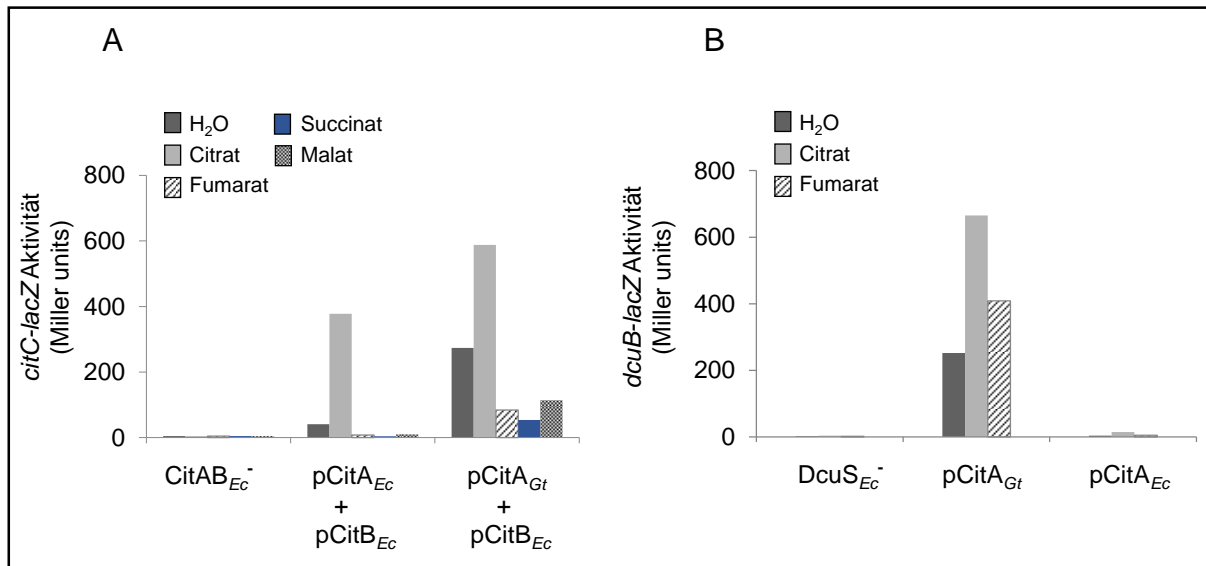


Abb. D12: **Komplementation der Funktion von CitA_{Ec} (A) und DcuS_{Ec} (B) durch CitA aus *Geobacillus thermodenitrificans*.** Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin (50 mM), Gluconat (5 mM), DMSO (20 mM), mit oder ohne Zugabe der Effektoren (20 mM). (A) Die Funktion von CitA wurde anhand der *citC-lacZ* Expression gemessen. In den CitAB-negativen Stamm IMW549 (*citAB*⁻; *citC-lacZ*) erfolgte die Cotransformation von plasmidkodiertem CitA_{Ec} (pMW1651; pCitA_{Ec}) bzw. CitA_{Gt} (pMW1652; pCitA_{Gt}) mit CitB_{Ec} (pMW1653; pCitB_{Ec}). (B) Die Funktion von DcuS wurde anhand der *dcuB-lacZ* Expression gemessen. Die Plasmide pMW1651 (pCitA_{Ec}) bzw. pMW1652 (pCitA_{Gt}) wurden für die Expressionsmessungen in den Stamm IMW260 (*dcuS*⁻; *dcuB-lacZ*) transformiert. (Abb. verändert nach Parowatkin, 2012)

G. thermodenitrificans zeigte in Minimalmedium kein Wachstum auf Citrat, das Wachstum wurde durch die Zugabe von Citrat sogar gehemmt (Parowatkin, 2012). Da Citrat ein natürlicher Komplexbildner ist, wurden vermutlich im Minimalmedium durch Citrat wichtige Spurenelemente für das Wachstum von *G. thermodenitrificans* weggefangen. Die Wachstumsexperimente sollten unter anderen Bedingungen wiederholt werden. Auf Grund der Existenz des Citratsensors CitA_{Gt} ist Wachstum von *G. thermodenitrificans* auf Citrat wahrscheinlich. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der natürliche Induktor des CitAB-Zweikomponentensystems aus *G. thermodenitrificans* eine verwandte Tricarbonsäure oder eine andere Carbonsäure ist.

Für den Tricarbonsäurestoffwechsel in *G. thermodenitrificans* wird folgende Regulation durch CitAB vorgeschlagen (Abb. D13). Citrat wird durch die PASp-Domäne von CitA_{Gt} erkannt. Die Kinasedomäne von CitA_{Gt} ist konserviert und die Aktivierung des Responseregulators CitB_{Gt} erfolgt wahrscheinlich ähnlich der von CitB aus *E. coli*. Im Chromosom von *G. thermodenitrificans* liegen stromabwärts von *citAB* in direkter Nachbarschaft Gene, welche für ein potientes Tripartit Tricarboxylat Transportsystem (TTT) kodieren (Abb. D13). Transportsysteme des TTT-Typs sind wie die TRAP-Transporter sekundär aktiv und benötigen ein extrazelluläres Bindeprotein für die Substraterkennung (Winnen et al., 2003). Das potentielle TTT-System aus *G. thermodenitrificans* besitzt Sequenzhomologie zu dem TctCBA-System aus *Salmonella typhimurium* und dem BctCBA-System aus *Bordetella*

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*. *J. Bacteriol.*, 186: 1879–1889.
- Allen, S., Zaleski, A., Johnston, J.W., Gibson, B.W., and Apicella, M.A. (2005). Novel sialic acid transporter of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.*, 73: 5291–5300.
- Antoine, R., Huvent, I., Chemlal, K., Deray, I., Raze, D., Locht, C., and Jacob-Dubuisson, F. (2005). The periplasmic binding protein of a tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction. *J. Mol. Biol.*, 351: 799–809.
- Arantes, O., and Lereclus, D. (1991). Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, 108: 115–119.
- Asai, K., Baik, S.H., Kasahara, Y., Moriya, S., and Ogasawara, N. (2000). Regulation of the transport system for C₄-dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 146 (Pt 2): 263–271.
- Bagos, P.G., Tsirigos, K.D., Plessas, S.K., Liakopoulos, T.D., and Hamodrakas, S.J. (2009). Prediction of signal peptides in archaea. *Protein Eng. Des. Sel.*, 22: 27–35.
- Barynin, V.V., Whittaker, M.M., Antonyuk, S.V., Lamzin, V.S., Harrison, P.M., Artymiuk, P.J., and Whittaker, J.W. (2001). Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. *Structure*, 9: 725–738.
- Berger, E.A. (1973). Different mechanisms of energy coupling for the active transport of proline and glutamine in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 1514–1518.
- Berntsson, R.P.-A., Smits, Sander H J, Schmitt, L., Slotboom, D.-J., and Poolman, B. (2010). A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.*, 584: 2606–2617.
- Blencke, H.-M., Homuth, G., Ludwig, H., Mäder, U., Hecker, M., and Stülke, J. (2003). Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab. Eng.*, 5: 133–149.
- Buelow, D.R., and Raivio, T.L. (2010). Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol. Microbiol.*, 75: 547–566.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., van Dorselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., and Hughson, F.M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 415: 545–549.
- Cheung, J., and Hendrickson, W.A. (2008). Crystal structures of C₄-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB. *J. Biol. Chem.*, 283: 30256–30265.
- 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 C(4)-dicarboxylate transport (dctA) gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 181: 5624–5635.
- Degreif-Dünnwald, P. (2011). PASC als signaltransduzierende Domäne des Sensorproteins DcuS von *Escherichia coli*. *Dissertation, Johannes Gutenberg Universität, Mainz*.

- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70: 939–1031.
- Doan, T., Servant, P., Tojo, S., Yamaguchi, H., Lerondel, G., Yoshida, K.-I., Fujita, Y., and Aymerich, S. (2003). The *Bacillus subtilis* ywkA gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM two-component system in response to malate. *Microbiology*, 149: 2331–2343.
- 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. *Eur. J. Biochem.*, 222: 605–614.
- Etzkorn, M., Kneuper, H., Dünwald, P., Vijayan, V., Krämer, J., and Griesinger, C., *et al.* (2008). Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15: 1031–1039.
- Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., and Gao, C., *et al.* (2007). Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104: 5602–5607.
- Fischer, M. (2012). Eine DcuS-ähnliche Sensorkinase aus *Aromatoleum aromaticum*. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.*
- Fischer, M., Zhang, Q.Y., Hubbard, R.E., and Thomas, G.H. (2010). Caught in a TRAP: substrate-binding proteins in secondary transport. *Trends Microbiol.*, 18: 471–478.
- Forward, J.A., Behrendt, M.C., and Kelly, D.J. (1993). Evidence that the high affinity C₄-dicarboxylate transport system of *Rhodobacter capsulatus* is a novel type of periplasmic permease. *Biochem. Soc. Trans.*, 21: 343S.
- Forward, J.A., Behrendt, M.C., Wyborn, N.R., Cross, R., and Kelly, D.J. (1997). TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the dctPQM genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 179: 5482–5493.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426: 147–153.
- Fujita, Y. (2009). Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73: 245–259.
- Gardina, P.J., Bormans, A.F., and Manson, M.D. (1998). A mechanism for simultaneous sensing of aspartate and maltose by the Tar chemoreceptor of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 29: 1147–1154.
- 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.

- Gilson, E., Alloing, G., Schmidt, T., Claverys, J.P., Dudler, R., and Hofnung, M. (1988). Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in *Mycoplasma*. *EMBO J.*, 7: 3971–3974.
- Goh, E.-B., Bledsoe, P.J., Chen, L.-L., Gyaneshwar, P., Stewart, V., and Igo, M.M. (2005). Hierarchical control of anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system. *J. Bacteriol.*, 187: 4890–4899.
- 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*. *J. Bacteriol.*, 181: 1238–1248.
- Graf, S. (2009). Der Fumaratsensor DcuS aus *Geobacillus kaustophilus*. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität, Mainz*.
- Groeneveld, M., Weme, Ruud G J Detert Oude, Duurkens, R.H., and Slotboom, D.J. (2010). Biochemical characterization of the C₄-dicarboxylate transporter DctA from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 192: 2900–2907.
- Guérout-Fleury, A.M., Shazand, K., Frandsen, N., and Stragier, P. (1995). Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*, 167: 335–336.
- 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. *J. Bacteriol.*, 177: 4121–4130.
- Hamblin, M.J., Shaw, J.G., Curson, J.P., and Kelly, D.J. (1990). Mutagenesis, cloning and complementation analysis of C₄-dicarboxylate transport genes from *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Microbiol.*, 4: 1567–1574.
- Hamblin, M.J., Shaw, J.G., and Kelly, D.J. (1993). Sequence analysis and interposon mutagenesis of a sensor-kinase (DctS) and response-regulator (DctR) controlling synthesis of the high-affinity C₄-dicarboxylate transport system in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.*, 237: 215–224.
- He, F., Nair, G.R., Soto, C.S., Chang, Y., Hsu, L., Ronzone, E., DeGrado, W.F., and Binns, A.N. (2009). Molecular basis of ChvE function in sugar binding, sugar utilization, and virulence in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, 191: 5802–5813.
- Holloway, P.W. (1973). A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal. Biochem.*, 53: 304–308.
- Hulett, F.M. (1996). The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 19: 933–939.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohashi, A., and Harada, H. (2002). *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 1729–1735.
- Iuchi, S., and Lin, E.C. (1992). Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 174: 5617–5623.

- Janausch, I.G., Garcia-Moreno, I., and Unden, G. (2002a). Function of DcuS from *Escherichia coli* as a fumarate-stimulated histidine protein kinase *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 277: 39809–39814.
- Janausch, I.G., Zientz, E., Tran, Q.H., Kröger, A., and Unden, G. (2002b). C₄-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1553: 39–56.
- 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.
- Jannièrè, L., Bruand, C., and Ehrlich, S.D. (1990). Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors. *Gene*, 87: 53–61.
- 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. *J. Bacteriol.*, 175: 3401–3407.
- Jones, D.T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.*, 292: 195–202.
- Jording, D., Sharma, P., Schmidt, R., Engelke, T., Uhde, C., and Pühler, A. (1993). Regulatory aspects of the C₄-dicarboxylate transport in *Rhizobium meliloti*-transcriptional activation and dependence on effective symbiosis. *Journal of Plant Physiology*, 141: 18–27.
- Jung, K., Tjaden, B., and Altendorf, K. (1997). Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 272: 10847–10852.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 5752–5756.
- 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. *J. Bacteriol.*, 187: 2233–2243.
- Karinou, E., Compton, Emma L R, Morel, M., and Javelle, A. (2013). The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C₄-dicarboxylic acid transporter. *Mol. Microbiol.*, 87: 623–640.
- Kaspar, S., and Bott, M. (2002). The sensor kinase CitA (DpiB) of *Escherichia coli* functions as a high-affinity citrate receptor. *Arch. Microbiol.*, 177: 313–321.
- Kay, W.W., and Kornberg, H.L. (1969). Genetic control of the uptake of C₄-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 3: 93–96.
- Kelly, D.J., and Thomas, G.H. (2001). The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 405–424.
- 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. (2006). Der Carrier DcuB als zweiter Sensor des Zweikomponentensystems DcuSR in *Escherichia coli*. *Dissertation, Johannes Gutenberg Universität, Mainz*.

- Kleefeld, A., Ackermann, B., Bauer, J., Krämer, J., and Uden, G. (2009). The fumarate/succinate antiporter DcuB of *Escherichia coli* is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.*, 284: 265–275.
- Kleijn, R.J., Buescher, J.M., Le Chat, L., Jules, M., Aymerich, S., and Sauer, U. (2010). Metabolic fluxes during strong carbon catabolite repression by malate in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 285: 1587–1596.
- Klier, A., Msadek, T., and Rapoport, G. (1992). Positive regulation in the gram-positive bacterium: *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 46: 429–459.
- Kneuper, H., Janausch, I.G., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Bock, V., Griesinger, C., and Uden, G. (2005). The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 280: 20596–20603.
- Kneuper, H., Scheu, P.D., Etzkorn, M., and Sevvana (2010). Sensing ligands by periplasmic sensing histidine kinases with sensory PAS domains. *Sensory mechanisms in bacteria*: 39–59.
- Kunst, F., and Rapoport, G. (1995). Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 177: 2403–2407.
- Labarre, C., Guzzo, J., Cavin, J.F., and Diviès, C. (1996). Cloning and characterization of the genes encoding the malolactic enzyme and the malate permease of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1274–1282.
- Lancaster, C.R., and Kröger, A. (2000). Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim. Biophys. Acta*, 1459: 422–431.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., and McWilliam, H., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947–2948.
- Liu, P. (1952). Utilization of carbohydrates by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 64: 773–781.
- Lulko, A.T., Buist, G., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2007). Transcriptome analysis of temporal regulation of carbon metabolism by CcpA in *Bacillus subtilis* reveals additional target genes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 12: 82–95.
- Lütgens, M., and Gottschalk, G. (1980). Why a co-substrate is required for anaerobic growth of *Escherichia coli* on citrate. *J. Gen. Microbiol.*, 119: 63–70.
- Marino, M., Ramos, H.C., Hoffmann, T., Glaser, P., and Jahn, D. (2001). Modulation of anaerobic energy metabolism of *Bacillus subtilis* by arfM (ywiD). *J. Bacteriol.*, 183: 6815–6821.
- Martin-Verstraete, I., Débarbouillé, M., Klier, A., and Rapoport, G. (1994). Interactions of wild-type and truncated LevR of *Bacillus subtilis* with the upstream activating sequence of the levanase operon. *J. Mol. Biol.*, 241: 178–192.
- Meyer, F.M., Jules, M., Mehne, Felix M P, Le Coq, D., Landmann, J.J., Görke, B., Aymerich, S., and Stülke, J. (2011). Malate-mediated carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis* involves the HPrK/CcpA pathway. *J. Bacteriol.*, 193: 6939–6949.
- Miller, J. (1992). A short course in bacterial genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.

- 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. *J. Mol. Biol.*, 260: 289–298.
- Montie, T.C. (1998). *Pseudomonas*. Plenum Press, Inc., New York, NY.
- Monzel, C., Degreif-Dünnwald, P., Gröpper, C., Griesinger, C., Unden, G. (2013). The cytoplasmic PASc domain of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: role in signal transduction, dimer formation, and DctA interaction. *Microbiology Open*.
- Müller, A., Severi, E., Mulligan, C., Watts, A.G., Kelly, D.J., Wilson, K.S., Wilkinson, A.J., and Thomas, G.H. (2006). Conservation of structure and mechanism in primary and secondary transporters exemplified by SiaP, a sialic acid binding virulence factor from *Haemophilus influenzae*. *J. Biol. Chem.*, 281: 22212–22222.
- Müller, V.S., Jungblut, P.R., Meyer, T.F., and Hunke, S. (2011). Membrane-SPINE: an improved method to identify protein-protein interaction partners of membrane proteins *in vivo*. *Proteomics*, 11: 2124–2128.
- Mulligan, C., Geertsma, E.R., Severi, E., Kelly, D.J., Poolman, B., and Thomas, G.H. (2009). The substrate-binding protein imposes directionality on an electrochemical sodium gradient-driven TRAP transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106: 1778–1783.
- Mulligan, C., Fischer, M., and Thomas, G.H. (2011). Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. *FEMS Microbiol. Rev.*, 35: 68–86.
- 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 Pt 1: 263–273.
- Nadeau, O.W., and Carlson, G.M. (2007). Protein Interactions Captured by Chemical Cross-linking: One-Step Cross-linking with Formaldehyde. *CSH Protoc*, 2007: pdb.prot4634.
- Nakano, M.M., Zuber, P., Glaser, P., Danchin, A., and Hulett, F.M. (1996). Two-component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of *fnr* upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 178: 3796–3802.
- Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., and Ivanova, A.E., *et al.* (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 433–446.
- Neiditch, M.B., Federle, M.J., Miller, S.T., Bassler, B.L., and Hughson, F.M. (2005). Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol. Cell*, 18: 507–518.
- 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.

- Pappalardo, L., Janausch, I.G., Vijayan, V., Zientz, E., Junker, J., and Peti, W., *et al.* (2003). The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 278: 39185–39188.
- Parkinson, J.S., and Kofoed, E.C. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 26: 71–112.
- Parowatkin, M. (2012). Charakterisierung der Sensorkinase CitA aus *Geobacillus thermodenitrificans*. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität, Mainz*.
- Paternostre, M.T., Roux, M., and Rigaud, J.L. (1988). Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry*, 27: 2668–2677.
- Perlman, D., and Halvorson, H.O. (1983). A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J. Mol. Biol.*, 167: 391–409.
- Rabin, R.S., and Stewart, V. (1993). Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 175: 3259–3268.
- Rabus, R., Jack, D.L., Kelly, D.J., and Saier, M.H. (1999). TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters. *Microbiology*, 145 (Pt 12): 3431–3445.
- Reents, H., Münch, R., Dammeyer, T., Jahn, D., and Härtig, E. (2006). The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 188: 1103–1112.
- Reid, C.J., and Poole, P.S. (1998). Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.*, 180: 2660–2669.
- Reinelt, S., Hofmann, E., Gerharz, T., Bott, M., and Madden, D.R. (2003). The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. *J. Biol. Chem.*, 278: 39189–39196.
- Rigaud, J.L., Paternostre, M.T., and Bluzat, A. (1988). Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 27: 2677–2688.
- Rigaud, J.L., Pitard, B., and Levy, D. (1995). Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1231: 223–246.
- Ronson C. W. (1988). Genetic regulation of C₄-dicarboxylate transport in rhizobia. *Nitrogen Fixation*: 547–551.
- Rucktooa, P., Antoine, R., Herrou, J., Huvent, I., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., and Bompard, C. (2007). Crystal structures of two *Bordetella pertussis* periplasmic receptors contribute to defining a novel pyroglutamic acid binding DctP subfamily. *J. Mol. Biol.*, 370: 93–106.

- Rudeck, S. (2011). Dct-Proteine aus *Geobacillus kaustophilus*. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Sambrook J., and Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition), Volume 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanowar, S., and Le Moual, H. (2005). Functional reconstitution of the *Salmonella typhimurium* PhoQ histidine kinase sensor in proteoliposomes. *Biochem. J.*, 390: 769–776.
- Scheu, P.D., Kim, O.B., Griesinger, C., and Uden, G. (2010). Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: exogenous versus endogenous sensing of C₄-dicarboxylates in bacteria. *Future Microbiol.*, 5: 1383–1402.
- Scheu, P.D., Witan, J., Rauschmeier, M., Graf, S., Liao, Y.-F., and Ebert-Jung, A., et al. (2012). CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system *in vivo*. *J. Bacteriol.*, 194: 636–645.
- Schmieden, D. (2013). Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Severi, E., Randle, G., Kivlin, P., Whitfield, K., Young, R., and Moxon, R., et al. (2005). Sialic acid transport in *Haemophilus influenzae* is essential for lipopolysaccharide sialylation and serum resistance and is dependent on a novel tripartite ATP-independent periplasmic transporter. *Mol. Microbiol.*, 58: 1173–1185.
- Sevvana, M., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Reinelt, S., Madden, D.R., and Herbst-Irmer, R., et al. (2008). A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. *J. Mol. Biol.*, 377: 512–523.
- Shaw, D.J., and Guest, J.R. (1982). Amplification and product identification of the *fnr* gene of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 2221–2228.
- Shaw, J.G., Hamblin, M.J., and Kelly, D.J. (1991). Purification, characterization and nucleotide sequence of the periplasmic C₄-dicarboxylate-binding protein (DctP) from *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Microbiol.*, 5: 3055–3062.
- Silhavy, T.J., Berman, M.L., Enquist, L.W. (1984). Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Singh, K.D., Schmalisch, M.H., Stülke, J., and Görke, B. (2008). Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources. *J. Bacteriol.*, 190: 7275–7284.
- Six, S., Andrews, S.C., Uden, 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). *J. Bacteriol.*, 176: 6470–6478.
- Stahl, C.L., and Sojka, G.A. (1973). Growth of *Rhodospseudomonas capsulata* on L- and D-malic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 297: 241–245.
- Stewart, V. (1993). Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 9: 425–434.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, 189: 113–130.

- Sutcliffe, I.C., and Harrington, D.J. (2002). Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology*, 148: 2065–2077.
- Sutherland, B.W., Toews, J., and Kast, J. (2008). Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J Mass Spectrom*, 43: 699–715.
- Takami, H., Nishi, S., Lu, J., Shimamura, S., and Takaki, Y. (2004). Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench. *Extremophiles*, 8: 351–356.
- Tam, R., and Saier, M.H. (1993). Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.*, 57: 320–346.
- Tanaka, K., Kobayashi, K., and Ogasawara, N. (2003). The *Bacillus subtilis* YufLM two-component system regulates the expression of the malate transporters MaeN (YufR) and YfIS, and is essential for utilization of malate in minimal medium. *Microbiology*, 149: 2317–2329.
- Tetsch, L., and Jung, K. (2009). The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Mol. Microbiol.*, 73: 982–991.
- Thomas, G.H., Southworth, T., León-Kempis, M.R., Leech, A., and Kelly, D.J. (2006). Novel ligands for the extracellular solute receptors of two bacterial TRAP transporters. *Microbiology*, 152: 187–198.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 4350–4354.
- Tseng, C.P., Yu, C.C., Lin, H.H., Chang, C.Y., and Kuo, J.T. (2001). Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB, and FumC) activity. *J. Bacteriol.*, 183: 461–467.
- Uden, G., and Trageser, M. (1991). Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: control of anaerobic respiration by the FNR protein. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 59: 65–76.
- Wach, A. PCR-Synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast Functional Analysis Reports*, 1996: 259–265.
- Walmsley, A.R., Shaw, J.G., and Kelly, D.J. (1992a). The mechanism of ligand binding to the periplasmic C₄-dicarboxylate binding protein (DctP) from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.*, 267: 8064–8072.
- Walmsley, A.R., Shaw, J.G., and Kelly, D.J. (1992b). Perturbation of the equilibrium between open and closed conformations of the periplasmic C₄-dicarboxylate binding protein from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry*, 31: 11175–11181.
- Wang, L., Tang, Y., Wang, S., Liu, R.-L., Liu, M.-Z., Zhang, Y., Liang, F.-L., and Feng, L. (2006). Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes. *Extremophiles*, 10: 347–356.
- Weinrauch, Y., Msadek, T., Kunst, F., and Dubnau, D. (1991). Sequence and properties of comQ, a new competence regulatory gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 173: 5685–5693.

- West, A.H., and Stock, A.M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.*, 26: 369–376.
- White, D., Sharp, R.J., and Priest, F.G. (1993). A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from a wide geographical area. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64: 357–386.
- White, P.J. (1972). The nutrition of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. *Journal of General Microbiology*: 505–514.
- Widenhorn, K.A., Boos, W., Somers, J.M., and Kay, W.W. (1988). Cloning and properties of the *Salmonella typhimurium* tricarboxylate transport operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 170: 883–888.
- Wilkinson, A. (2002). ABC Proteins: From Bacteria to Man. *Elsevier Science and Technology Books, London*.
- Winnen, B., Hvorup, R.N., and Saier, M.H. (2003). The tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family. *Res. Microbiol.*, 154: 457–465.
- Winstedt, L., and Wachenfeldt, C. von (2000). Terminal oxidases of *Bacillus subtilis* strain 168: one quinol oxidase, cytochrome aa(3) or cytochrome bd, is required for aerobic growth. *J. Bacteriol.* 182: 6557–6564.
- 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 Uden, G. (2012a). Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Mol. Microbiol.*, 85: 846–861.
- Witan, J., Monzel, C., Scheu, P.D., and Uden, G. (2012b). The sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: two stimulus input sites and a merged signal pathway in the DctA/DcuS sensor unit. *Biol. Chem.*, 393: 1291–1297.
- Wörner, S. (2013). Substratspezifität des Sensors DcuS und der Transporter DcuB und DctA. *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität, Mainz*.
- Yamaguchi, K., Yu, F., and Inouye, M. (1988). A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell*, 53: 423–432.
- Yamamoto, H., Murata, M., and Sekiguchi, J. (2000). The CitST two-component system regulates the expression of the Mg-citrate transporter in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 37: 898–912.
- Yamamoto, K., Matsumoto, F., Oshima, T., Fujita, N., Ogasawara, N., and Ishihama, A. (2008). Anaerobic regulation of citrate fermentation by CitAB in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72: 3011–3014.
- 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.
- Yarosh, O.K., Charles, T.C., and Finan, T.M. (1989). Analysis of C₄-dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.*, 3: 813–823.

- Young, G.B., Jack, D.L., Smith, D.W., and Saier, M.H. (1999). The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim. Biophys. Acta*, 1415: 306–322.
- Youngman, P. (1990). Use of transposons and integrational vectors for mutagenesis and construction of gene fusions in *Bacillus* species. C. R. Harwood and S. M. Cutting (ed.), *Molecular biological methods for bacillus*. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom: 221–266.
- Zientz, E., Bongaerts, J., and Uden, G. (1998). Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (dcuSR genes) two-component regulatory system. *J. Bacteriol.*, 180: 5421–5425.
- Zientz, E., Six, S., and Uden, 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. *J. Bacteriol.*, 178: 7241–7247.

7 Veröffentlichungen und Präsentationen

Veröffentlichungen

- Graf, S., Schmieden, D., Tschauener, K., Hunke, S., Uden, G. (2013). The tripartite DctS/DctA/DctB complex for sensing C₄-dicarboxylates in *Bacillus subtilis*. (Manuskript in Bearbeitung)
- Kim, O.B., Richter, H., Zaubmüller, T., Graf, S., and Uden, G. (2011). Role of secondary transporters and phosphotransferase systems in glucose transport by *Oenococcus oeni*. *J. Bacteriol.*, 193: 6902–6911.
- Scheu, P.D., Witan, J., Rauschmeier, M., Graf, S., Liao, Y.-F., and Ebert-Jung, A., *et al.* (2012). CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system *in vivo*. *J. Bacteriol.*, 194: 636–645.

Vorträge

- Graf, S., Uden, G. (2013)
The *Bacillus subtilis* DctSR system uses a DctB binding protein as third component.
Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM),
Bremen
- Graf, S., Uden, G. (2011)
The fumarate sensor DctS of *Geobacillus kaustophilus*.
BACELL Meeting, European *Bacillus* Community, Göttingen

Poster

- Graf, S., Uden, G. (2010)
The fumarate sensor DctS of *Geobacillus kaustophilus*.
Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM),
Hannover