

**Struktur- und Funktionsuntersuchungen
des C₄-Dicarboxylat-Sensors DcuS
von *Escherichia coli***

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Holger Kneuper
geb. am 26.11.1972 in Speyer

Mainz, August 2005

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 2005

Inhalt

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
3. Material und Methoden	6
3.1 Verwendete Stämme von <i>Escherichia coli</i>	6
3.2 Medien und Zucht von <i>Escherichia coli</i>	7
3.3 Molekulargenetische Methoden	9
3.4. Biochemische Methoden	15
4. Ergebnisse	21
4.1. Substratspezifität von DcuS	21
4.2. Funktionsweise von DcuS in der Membran	24
Cysteinmutagenese von DcuS	26
Funktionalitätstest der Cysteinmutanten	28
Überexpression und Reinigung der Cysteinmutanten von DcuS	29
Nitroxidmarkierung der Cysteinmutanten	31
Rekonstitution der spinmarkierten Cysteinmutanten von DcuS in Liposomen	32
EPR Spektroskopie der Cysteinmutanten von DcuS	33
4.3. Strukturuntersuchungen von DcuS in der Membran	37
Konstruktion der Proteasemutanten von DcuS	37
Konstruktion von C-terminal verkürztem DcuS für die NMR-Spektroskopie	41
Untersuchung der 3D-Struktur von DcuS-PD/PAS durch NMR-Spektroskopie	46
5. Diskussion	52
Substratspezifität der Histidinkinase DcuS	52
Oligomerisierung von DcuS in der Membran	55
Struktur und Funktionsweise von DcuS	59
6. Veröffentlichungen	61
7. Literatur	62

1. Zusammenfassung

Das Zweikomponentensystem DcuSR reguliert die Expression der Gene der anaeroben Fumaratatmung in *Escherichia coli*. Durch die periplasmatische Substratbindedomäne der membranständigen Sensorkinase DcuS werden externe C₄-Dicarboxylate erkannt. Bindung des Effektors führt zu einer Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes in der cytoplasmatischen Kinasedomäne. Die Phosphorylierung wird an den Responseregulator DcuR weitergegeben, der im aktivierten Zustand die Expression seiner Zielgene reguliert.

Das bisher bekannte Substratspektrum von DcuS wurde durch weitere Untersuchungen ergänzt und die strukturellen Eigenschaften der induzierenden Substrate beschrieben. Die Affinität des Sensors zu verschiedenen Dicarbonsäuren korreliert dabei mit der Stärke der Induktion *in vivo*.

DcuS ist eine für Bakterien typische membranständige Histidinkinase. Die Phosphorylierung des konservierten Histidinrestes nach Detektion des Reizes erfolgt vermutlich in einem Dimer durch die katalytische Domäne des zweiten Monomers. Der funktionelle Zustand von DcuS in der Membran in Anwesenheit und in Abwesenheit des Effektors sollte durch EPR-Messungen bestimmt werden. Es wurden Cysteinmutanten von DcuS hergestellt, die entweder völlig frei von Cysteinresten waren, oder Cysteinreste an definierten Positionen in der periplasmatischen Domäne trugen. Die Mutanten besaßen *in vivo* ähnliche Funktionalität wie Wildtyp-DcuS. Die Proteine wurden isoliert und für die EPR-Spektroskopie über die eingeführten Cysteine mit Nitroxiden markiert. Nach Rekonstitution in Liposomen zeigte DcuS ein Verhalten, das sich deutlich vom löslichen Protein unterschied. Nur im rekonstituierten DcuS wurden diskrete Abstände zwischen den Monomeren festgestellt.

Für den Signaltransfer von der periplasmatischen Substratbindedomäne zur cytoplasmatischen Kinasedomäne spielen die Transmembranhelices eine zentrale Rolle. NMR-spektroskopische Untersuchungen der Struktur der Membranbereiche von DcuS sollen die Vorgänge beim Signaltransfer über die Membran klären. Für die Strukturuntersuchungen wurde eine C-terminal verkürzte Variante von DcuS hergestellt. Diese Variante umfasst den N-terminalen Bereich von DcuS inklusive der kompletten cytoplasmatischen PAS-Domäne. DcuS-PD/PAS wurde überproduziert, isoliert und in Liposomen rekonstituiert. Die Struktur von DcuS-PD/PAS in Liposomen wird durch Festkörper-NMR untersucht.

2. Einleitung

Regulation der Atmung in *Escherichia coli*

Escherichia coli ist ein fakultativ anaerobes Enterobakterium, das für das Wachstum unter respiratorischen Bedingungen verschiedene Elektronenakzeptoren nutzen kann. Neben O_2 ($E_0' + 0,82$ V) in der aeroben Atmung werden unter anaeroben Bedingungen Nitrat (NO_3^- , $E_0' + 0,42$ V), Dimethylsulfoxid (DMSO, $E_0' + 0,16$ V), Trimethylamin-N-oxid (TMAO, $E_0' + 0,13$ V) und Fumarat ($E_0' + 0,03$ V) verwendet. Für diese Systeme ist eine unterschiedliche Ausstattung an Enzymen nötig. Neben den spezifischen terminalen Reduktasen (Unden and Bongaerts, 1997) sind für die anaeroben Elektronenakzeptoren Transportproteine zur Aufnahme in die Zelle erforderlich. Die Nutzung der Elektronenakzeptoren folgt einer strikten Hierarchie, die durch das Redoxpotential bestimmt wird. Die elektropositiveren Elektronenakzeptoren werden dabei bevorzugt, da sie die höhere Energieausbeute ermöglichen. Die Anwesenheit von O_2 in der Umgebung unterdrückt so die Expression aller anaeroben Systeme. Unter anaeroben Bedingungen wird NO_3^- bevorzugt und reprimiert seinerseits die Systeme der DMSO-, TMAO- und Fumaratatumung. Die selektive Aktivierung der Stoffwechselwege schont die Ressourcen des Bakteriums.

Die Regulation der hierarchischen Aktivierung dieser Systeme erfolgt fast ausschließlich über Zweikomponentensysteme. Die Expression der Gene am Übergang zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen wird durch den globalen Regulator FNR (Fumarat/Nitrat Regulator) und das Zweikomponentensystem ArcBA reguliert. FNR induziert die Expression der Gene für den anaeroben Stoffwechsel (Shaw *et al.* 1982), während ArcBA die Gene des aeroben Stoffwechsels unter Anaerobiose reprimiert (Iuchi and Lin, 1988; Iuchi *et al.*, 1989). Die Regulation der Nitratatumung erfolgt durch die zwei homologen Zweikomponentensysteme NarXL und NarQP (Stewart, 1993; Stewart and Rabin, 1995). Die Expression der Gene der Nitratatumung wird induziert und die nachrangigen anaeroben Systeme reprimiert. Am Ende dieser Hierarchie steht die Fumaratatumung. Die Expression der benötigten Gene wird durch das Zweikomponentensystem DcuSR reguliert.

Zweikomponentensysteme

Zweikomponentensysteme stellen einen in den Eubakterien weit verbreiteten Mechanismus zur Signaltransduktion dar. So wurden im Genom von *E. coli* 30 verschiedene Systeme identifiziert (Mizuno, 1997). Der Prototyp des Zweikomponentensystems besteht aus einem Sensorprotein, der Histidinkinase, und einem Responseregulator. Die Histidinkinase enthält

eine N-terminale Sensordomäne und eine C-terminale konservierte Kinasedomäne (auch als Transmitterdomäne bezeichnet), der Responseregulator eine konservierte Regulatordomäne. Die meist membrangebundene Histidinkinase detektiert einen extrazellulären Reiz und leitet diesen an den cytoplasmatischen Responseregulator weiter. Die Aufnahme des Reizes durch die Sensordomäne bewirkt über Konformationsänderungen die ATP-abhängige Phosphorylierung eines konservierten Histidinrestes in der Kinasedomäne des Sensors. Die Phosphorylierung wird anschließend auf einen ebenfalls konservierten Aspartatrest in der Regulatordomäne des Responseregulators weitergegeben (Parkinson and Kofoid, 1992). Dort bewirkt die Phosphorylierung durch kleine Konformationsänderungen eine Aktivierung einer C-terminalen Effektor-domäne (Stock *et al.*, 2000). Der aktivierte Responseregulator reguliert in den meisten Fällen die Expression von Genen durch Bindung an die DNA. In geringem Umfang kommen auch Responseregulatoren mit enzymatischer Aktivität (Simms *et al.*, 1985; Shaulsky *et al.*, 1996) oder ohne Effektor-domäne vor (Welch *et al.*, 1993; Burbulys *et al.*, 1991).

Das DcuSR Zweikomponentensystem aus *E. coli*

Das DcuSR Zweikomponentensystem (Abb. 1) besteht aus der Histidinkinase DcuS und dem Responseregulator DcuR. Die codierenden Gene *dcuS* und *dcuR* liegen in einem Operon stromabwärts der Gene der Fumarase FumB (*fumB*) und dem C₄-Dicarboxylattransporter DcuB (*dcuB*). Es reguliert in *E. coli* die Expression der Gene für die anaerobe Fumarat-atmung in Abhängigkeit von Fumarat oder anderen C₄-Dicarbonsäuren (Aspartat, Malat, Succinat), die leicht in Fumarat überführt werden können (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999).

Die Aktivierung von DcuS durch externe Substrate führt zu einer Autophosphorylierung des Histidinrestes 349 der Kinasedomäne. Der Phosphatrest wird auf DcuR übertragen (Janausch *et al.*, 2002), das in der aktiven Form die Expression der Zielgene stimuliert. Zu den Zielgenen zählen *dctA*, *dcuB* und das *frdABCD*-Operon. *dctA* und *dcuB* codieren für aerob (DctA) und anaerob (DcuB) gebildete C₄-Dicarboxylattransporter (Davies *et al.*, 1999; Engel *et al.*, 1992), *frdABCD* für die Untereinheiten des Fumaratdehydrogenase-Komplexes. DcuR bindet dabei an AT-reiche Sequenzen der Promotorbereiche dieser Gene (Abo-Amer *et al.*, 2004). Die anaerobe Fumarase B (*fumB*) wird nicht direkt durch DcuR reguliert (Tseng, 1997), jedoch teilweise mit *dcuB* cotranskribiert und unterliegt somit indirekt einer Regulation durch DcuSR.

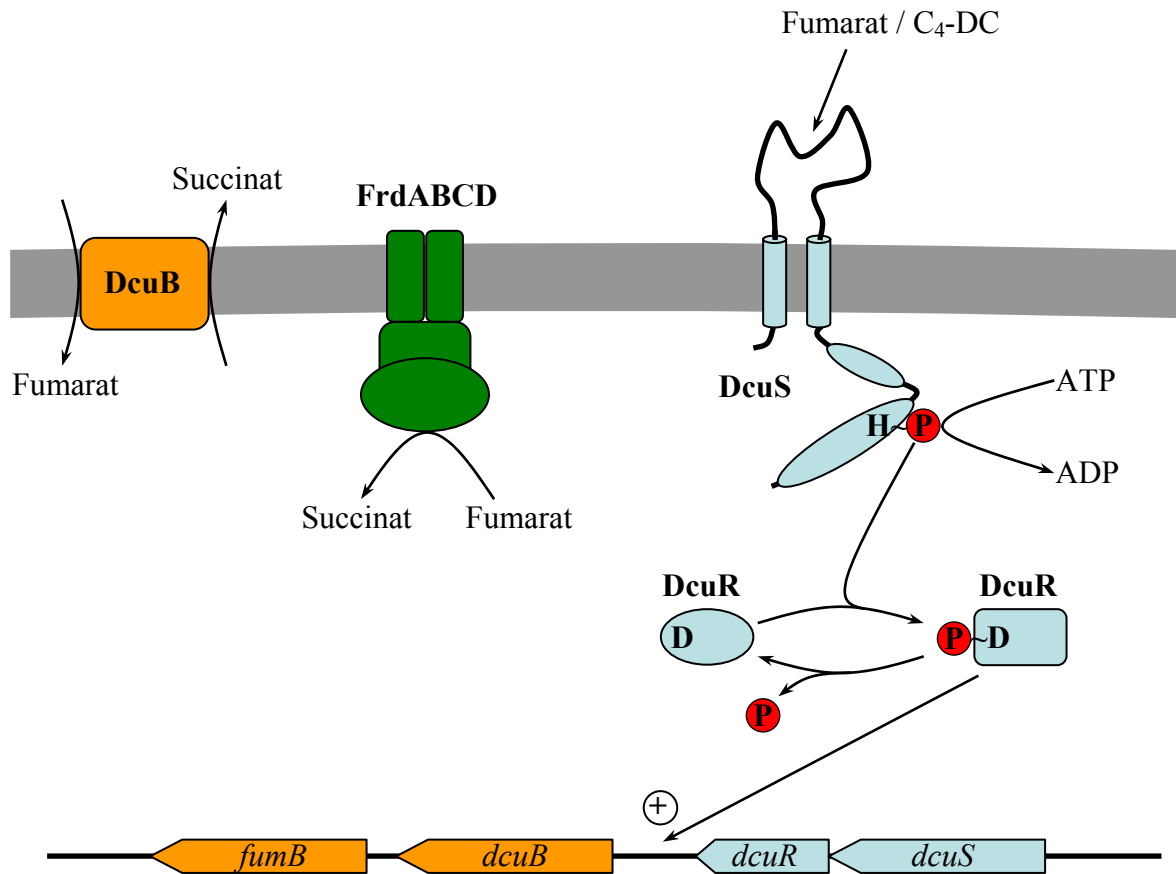


Abb. 1: Funktionsmodell des Zwei-Komponentensystems DcuSR. Die Anwesenheit externer Effektoren wird durch die Sensorkinase DcuS erkannt, worauf eine Autophosphorylierung erfolgt. Der Phosphatrest wird weiter zum Responseregulator DcuR transferiert. Durch Konformationsänderungen infolge der Phosphorylierung geht DcuR in den aktiven Zustand über und stimuliert die Expression seiner Zielgene. Zu diesen gehören der anaerobe Fumarat/Succinat Antiporter DcuB und die Fumaratreduktase FrdABCD.

Die Substraterkennung erfolgt bei DcuS durch die periplasmatische Domäne. In ihr konnten für die Substraterkennung wichtige Aminosäuren identifiziert werden (Janausch, 2001). In Kombination mit der Strukturaufklärung der periplasmatischen Domäne (Pappalardo *et al.*, 2003) konnten so genauere Informationen über die Substratbindestelle erhalten werden, wie sie nur für wenige Systeme bekannt sind (Milbourn *et al.*, 1991; Reinelt *et al.*, 2003).

Für die membranständigen Histidinkinasen ist der Signaltransfer über die Cytoplasmamembran zur Kinasedomäne weithin ungeklärt. Die Bindung des Effektors sollte in der periplasmatischen Domäne Konformationsänderungen auslösen, die über die Transmembranhelices zur Kinase weitergeleitet werden. Als Modell dafür dient der Aspartatsensor Tar aus dem Chemotaxissystem von *E. coli*. Chemotaxissensoren gehören jedoch einer anderen Klasse von Sensorproteinen an, die keine Sequenzähnlichkeiten zu den prototypischen Histidinkinasen aufweisen. Sie detektieren lediglich den extrazellulären Reiz und leiten ihn auf eine cytoplasmatische Histidinkinase weiter, die als eigenes Protein vorliegt

und das Signal in Form einer Phosphorylierung generiert. Sie stellen somit einen Sonderfall eines Zweikomponentensystems dar. Die Strukturaufklärung des kompletten Tar-Sensors (Bowie *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 1996) ermöglichte detaillierte Untersuchungen der Konformationsänderungen durch die Ligandenbindung (Chervitz *et al.*, 1995; Chervitz and Falke, 1995, 1996; Hughson and Hazelbauer, 1996; Ottemann *et al.*, 1998). Nach dem daraus abgeleiteten Kolbenhub-Modell (Piston-Modell) werden die Konformationsänderungen über eine parallele Verschiebung der Transmembranhelices zueinander über die Membran weitergeleitet.

Für die Autophosphorylierung des Histidinrestes der Kinasedomäne ist nach den Modellvorstellungen eine Dimerisierung der Kinasedomäne und damit des gesamten Sensors erforderlich (Parkinson and Kofoid, 1992; Hoch and Silhavy, 1995). Bisherige Studien, die aussagekräftige Modelle zur Dimerisierung membranständiger Histidinkinasen lieferten, wurden nur an isolierten löslichen Domänen durchgeführt. Zur Ermittlung des funktionellen Zustandes von DcuS in der Membran, sollte DcuS isoliert, in Membranen rekonstituiert und mittels EPR untersucht werden. Damit sollte direkt in der Membran der Oligomerisierungszustand von DcuS bestimmt werden. Dies ist nur mit speziellen Methoden möglich. Hier sollte mithilfe der EPR-Spektroskopie nach Markierung von DcuS mit einem Spinlabel die Oligomerisierung bestimmt werden.

In weiterführenden Experimenten sollte die Struktur von DcuS *in situ*, und Bewegungen von Sekundärstrukturelementen beim Signaltransfer durch Festkörper-NMR untersucht werden. Diese neue Methode, die gerade erst entwickelt wird, eignet sich, Strukturen von Proteinen auch in der Membran in hoher Auflösung zu bestimmen. Für diese Untersuchungen wurden geeignete Konstrukte von DcuS hergestellt, die in ihrer Größe weitgehend reduziert, aber noch membranintegriert sind.

Über das Substratspektrum von DcuS waren nur eingeschränkte Informationen vorhanden. In einleitenden Untersuchungen wurde die Affinität des Sensors für verschiedene Substrate gemessen.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Stämme von *Escherichia coli*

Tab. 1: Verwendete *E. coli* Stämme und Plasmide

Stamm	Genotyp	Referenz
AN387	Wildtyp	Wallace and Young, 1977
IMW237	MC4100, $\lambda[\Phi(\text{dcuB}'\text{'-}'\text{lacZ})]$ hyb amp ^R	Zientz <i>et al.</i> , 1998
IMW260	MC4100, $\lambda[\Phi(\text{dcuB}'\text{'-}'\text{lacZ})]$ hyb amp ^R <i>dcuS::cam</i> ^R	Zientz <i>et al.</i> , 1998
DH5 α	F ⁻ <i>gyrA96(Nal^r) recA1 relA1 endA1 thi-1</i> <i>hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) glnV44 deoR $\Delta(\text{lacZYA-argF})$</i> <i>U169 [$\Phi$80d $\Delta(\text{lacZ})M15]$</i>	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
JM105	F ⁺ <i>traD36 laqI^d <math>\Delta(\text{lacZ})M15 proA⁺B⁺ thi-1</math></i> <i>rpsL (Str^r) endA1 sbcB15 hsdR4 (r_K⁻m_K⁺) $\Delta(\text{lac-}$</i> <i>proAB)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> $\lambda(\text{DE3})$	Studier and Moffatt, 1986
C43(DE3)	spontane Mutation von BL21(DE3) zur Überproduktion von Membranproteinen	Miroux and Walker, 1996
Plasmide		
pET28a	Proteinexpressionsplasmid, Kan ^r	Novagen, Madison, USA
pGEX-4T-1	Proteinexpressionsplasmid, Amp ^r	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
pMW151	pET28a mit 2,2 kb <i>XbaI/HindIII</i> Fragment von <i>dcuS</i> , Kan ^r	Janausch, 2001
pMW247	pMW151, aber DcuS K232I, V235R, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW248	pMW151, aber DcuS V238I, D240G, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW249	pMW151, aber DcuS N248D, D249G, A250R, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW326	pMW151, aber DcuS K297E, D298G, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW327	pMW151, aber DcuS I315D, A317R, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW328	pMW151, aber DcuS L334I, L337R, Kan ^r	Diese Arbeit

pMW329	pMW151, aber DcuS R284I, T287R, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW306	pMW 151, aber DcuS S45C, C199S, C471S, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW307	pMW 151, aber DcuS S80C, C199S, C471S, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW308	pMW 151, aber DcuS S179C, C199S, C471S, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW324	pMW151, aber DcuS C199S, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW325	pMW151, aber DcuS C471S, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW330	pMW151, aber DcuS S45C, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW331	pMW151, aber DcuS S80C, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW332	pMW151, aber DcuS S179C, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW333	pMW151, aber DcuS S45C, C199S, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW334	pMW151, aber DcuS S80C, C199S, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW335	pMW151, aber DcuS S179C, C199S, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW336	pMW151, aber DcuS C199S, C471S, Kan ^r	Diese Arbeit
pMW250	pET28a mit 882 bp <i>NdeI/EcoRI</i> Fragment von <i>dcuS</i> , Kan ^r	Diese Arbeit
pMW309	pET28a mit 1003 bp <i>NdeI/XhoI</i> Fragment von <i>dcuS</i> , Kan ^r	Diese Arbeit
pMW310	pET28a mit 979 bp <i>NdeI/EcoRI</i> Fragment von <i>dcuS</i> , Kan ^r	Diese Arbeit
pMW311	pGEX-4T-1 mit 969 bp <i>BamHI/EcoRI</i> Fragment von <i>dcuS</i> , Amp ^r	Diese Arbeit
pDcuStm	pET28a mit 622 bp <i>NdeI/EcoRI</i> Fragment von <i>dcuS</i> , Kan ^r	Diese Arbeit

3.2 Medien und Zucht von *Escherichia coli*

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

10 g/l Caseinhydrolysat

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

LB-Agarplatten:

LB-Medium mit 15 g/l Agar

M9-Medium (Miller, 1992):

Stammlösung (10 x konzentriert):

60 g/l Na₂HPO₄

30 g/l KH₂PO₄

5 g/l NaCl

10 g/l NH₄Cl

Zusätze:

10 ml/l 10 mM CaCl₂

10 ml/l 10 % AHC

5 ml/l 1 % Tryptophan

1 ml/l 1 M MgSO₄

Die Stammlösung wurde getrennt von den Zusätzen autoklaviert und mit deionisiertem Wasser zur Endkonzentration aufgefüllt.

Antibiotikazusätze:

Chloramphenicol 20 µg/ml

Ampicillin 50 µg/ml

Kanamycin 50 µg/ml

Bei der gleichzeitigen Verwendung mehrerer Antibiotika wurden die entsprechenden Konzentrationen halbiert.

Zucht von *Escherichia coli*

Für Vorkulturen und Kulturen für genetische Arbeiten wurden die Bakterien in LB-Medium gezüchtet, dem nach Bedarf Antibiotika zugesetzt wurde.

Für Expressionsmessungen erfolgte die Zucht anaerob in M9-Medium, dem jeweils 50 mM Glycerin/DMSO und Effektor in variabler Konzentration zugesetzt wurde. Hierzu wurden gasdichte Druckflaschen benutzt, die in drei Durchgängen jeweils 10 min evakuiert und der entstehende Unterdruck durch N₂ (5.0, Linde) wieder ausgeglichen wurde.

Die Überproduktion von unmarkiertem Protein erfolgte in LB-Medium, dem 55,4 ml/l 2 M Glucose zugesetzt wurden. Zur Überproduktion von isotope markiertem Protein wurde M9-Medium ohne NH₄Cl verwendet und 1 g/l [¹⁵N]-(NH₄)₂Cl zugesetzt. Für doppelt markiertes Protein wurde zusätzlich 7mM [¹³C]-Glucose als C-Quelle verwendet. Die Kulturen wurden mit 1 – 2 % Inokulum angeimpft und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG bei einer OD_{578nm} von 0,6 – 0,8. Nach 3 h weiterer Inkubation wurden die Zellen geerntet. Zur Überprüfung der Induktion der

Proteinexpression wurde der Kultur zum Zeitpunkt der Induktion und der Ernte je 1 ml Probe entnommen. Die Überproduktion war auf einem SDS-Gel durch die Zunahme der Intensität der entsprechenden Proteinbande zu verfolgen.

3.3 Molekulargenetische Methoden

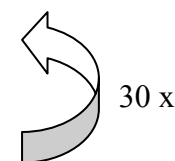
Soweit nicht anders angegeben wurden molekularbiologische Standardmethoden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Herstellung elektrokompenter Zellen und die Transformation erfolgte nach Farinha *et al.* (1990). Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach der Methode von Chen und Kuo (1993). Zur präparativen Isolierung von Plasmiden wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit oder der QIAGEN Plasmid Midi Kit der Firma QIAGEN verwendet. Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Ligationen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) über Nacht bei 16°C durchgeführt. Hierbei betrug das molare Verhältnis von Vektor zu Insert 1:3. Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von den Firmen MBI Fermentas und New England Biolabs.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde im Progene Thermocycler (Techne) oder dem iCycler (Bio-Rad) durchgeführt. Für die Klonierungen wurde die PLATINUM *Pfx*-DNA Polymerase der Firma Invitrogen eingesetzt. Ein Reaktionsansatz von 50 µl enthielt je 15 pmol Primer, ca. 20 ng (Plasmid-DNA) – 100 ng (genomische DNA) DNA-Matrize, 1 mM MgCl₂, 0,3 mM dNTP-Mix, 1 - 2,5 U PLATINUM *Pfx*-DNA-Polymerase und einfach konzentrierten Reaktionspuffer. Zur Amplifikation wurden die folgenden Zyklen durchgeführt:

Temperaturprofil der PCR

	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	95°C	3 min
2. Denaturierung	94°C	30 s
3. Annealing	T _A	30 s
4. Elongation	68°C	30 s/kb Produkt
5. Elongation	68°C	3 min



Je nach Länge der zu amplifizierenden DNA und den Schmelzpunkten der verwendeten Primer wurde das PCR-Protokoll modifiziert. Für je 1 kb zu amplifizierendes Produkt wurden 30 s Elongationszeit eingesetzt. Die Schmelzpunkte (T_m) der verwendeten Primer wurden nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times \%GC - 650/n$$

%GC GC-Gehalt der Oligonukleotidprimer in Prozent

n Anzahl der Basen der Oligonukleotidprimer (Primerlänge)

Die Hybridisierungstemperatur T_A wurde so gewählt, dass sie 3 – 5°C unter dem niedrigsten T_m der verwendeten Primer lag.

Tab. 2: Verwendete Oligonukleotide (MWG Biotech, Ebersberg, HPSF gereinigt)

Primer	Sequenz (5'→3')	T_m [°C]
dcuSPAS	CTTTAATCGAATTCTCTTAGTCGCG	59.7
dcuSPAS3	AGACCCTCGAGTTACTGCATC	59.8
dcuSPAS5	GTTTACGGAATTCAGTTTTGTCCC	59.3
dcuStmf	CCGAAAAGGAATTCTTTCAGTACC	59.3
dcuStmr	CACAAGGAAGCATATGAGACATTC	59.3
dcuSpET3	CATATGAGAGGATCCTTGCCC	59.8
midcuSseq	GTTTTCTGGCGCAGGCTTTACG	62.1

Expressionsplasmide

Zur Konstruktion eines Expressionsplasmids, von dem C-terminal verkürztes DcuS für die Festkörper-NMR überproduziert werden konnte, wurde am 3'-Ende verkürztes *dcuS* in pET28a hinter einen induzierbaren T7 Promotor kloniert. Die Expression erfolgte in *E. coli* C43, welches eine chromosomale Kopie der T7 RNA Polymerase unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors trägt. Dieses System ist durch Zugabe von IPTG induzierbar. Der Genabschnitt, der für den N-terminalen Bereich von DcuS inklusive der PAS-Domäne codiert, wurde mittels PCR mit den Primern *dcuStmr* und *dcuSPAS3* amplifiziert. Durch diese Primer wurden eine *NdeI* und eine *XhoI* Schnittstelle eingeführt, über die das Fragment von 1003 bp in pET28a kloniert werden konnte. Zusätzlich wurde mit dem Primer *dcuSPAS3*

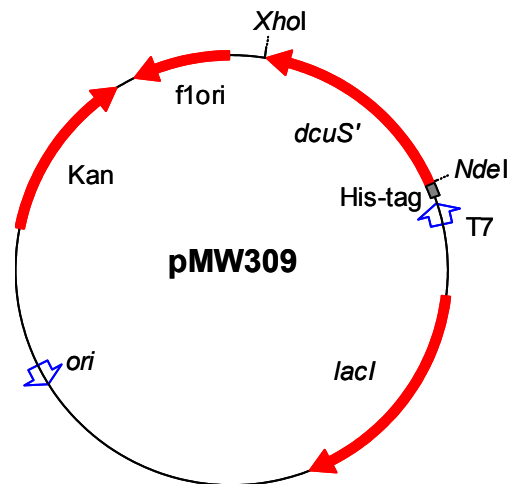


Abb. 2: Eigenschaften des Expressionsplasmids pMW309. Die Expression des verkürzten *dcuS'* steht unter der Kontrolle eines T7 Promotors (T7). 5'-terminal schließt sich daran die Sequenz für einen His-tag (schwarze Box) an.

an AS-Position 333 (Arg, CGA) ein Stopcodon (TAA) eingeführt. Aus dem resultierenden Expressionsplasmid pMW309 (Abb. 2) konnte DcuS-PD/PAS überproduziert werden. Das Protein DcuS-PD/PAS umfasst den N-terminalen Bereich von DcuS inklusive der cytoplasmatischen PAS-Domäne von AS 1 bis 332 und zusätzlich einen N-terminalen His-tag von 20 AS (Abb. 3)

NMGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM₁RHSLPYRMLRKRPMKLSTTVILMVSAVLFSVLLV
 VHLYYFSQISDMTRDGLANKALAVARTLADSPEIRQGLQKKPQESGIQAIAEAVRKRN
 DLLFIVVTDMQSLRYSHPAQIRIGQPFKGGDILKALNGEENVAINRGFLAQALRVFTPI
 YDENHKQIGVVAIGLELSRVTTQQINDSRWSIIWSVLFGLVGLIGTCILVKVLKILFG
 LEPYEISTLFEQRQAMLQSIKEGVVAVDDRGEVTLINDAAQELLYRKSQDDEKLSTL
 SHSWSQVVDVSEVLRDGTTPRRDEEITIKDRLLLINTVPVRSNGVIIGAISTFRDKTEVR
 KLMQ_{332C}

Abb. 3: Aminosäuresequenz von DcuS-PD/PAS. Das Protein besitzt einen N-terminalen His-tag von 20 AS (blau). Die Aminosäuresequenz aus DcuS (schwarz) umfasst die AS 1 - 332.

Analog zur Konstruktion des Expressionsplasmids pMW309 wurden die Plasmide pdcuStm, pMW250 und pMW310 auf Basis des Vektors pET28a hergestellt. Sie dienen ebenfalls zur Überproduktion verschiedener Varianten von C-terminal verkürztem DcuS mit N-terminalem His-tag.

Zur Konstruktion von pdcuStm wurde ein 5'-terminales Fragment von *dcuS* von 622 bp über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI* in pET28a kloniert, dass für die AS 1 – 206 codierte. 3'-terminal dazu folgte im Leserahmen eine Sequenz aus dem Plasmid, die für eine

kurze, C-terminale Extension von 24 AS codierte. Zur Amplifikation wurden die Primer *dcuStmr* und *dcuStmf* verwendet.

Zur Konstruktion von pMW250 wurde der 3'-terminale Bereich von *dcuS* in pET28a kloniert, der für die AS 1 – 291 codiert. Die Amplifikation erfolgte mit den Primern *dcuStmr* und *dcuSPAS*, mit denen eine *NdeI* und eine *EcoRI* Schnittstelle in das Produkt eingeführt wurden. Mit dem Primer *dcuSPAS* wurde das Codon für die AS 292 (Glu, GAA) gegen ein Stopcodon (TAA) ausgetauscht.

Für pMW310 wurde der 3'-terminale Bereich von *dcuS* mit den Primern *dcuStmr* und *dcuSPAS5* amplifiziert und über Restriktion mit *NdeI* und *EcoRI* in pET28a kloniert. Das *dcuS*-Fragment codiert für die AS 1 – 326 an die sich am 3'-Ende eine Sequenz aus dem Vektor anschloss, die für 23 zusätzliche AS codierte.

Zur Konstruktion des Expressionsplasmids pMW311 (Abb. 4) wurde ein 5'-terminales Fragment von *dcuS* mit den Primern *dcuSpET3* und *dcuSPAS5* amplifiziert und mittels *BamHI* und *EcoRI* in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert. Der klonierte Bereich codierte für die AS 4 – 326 von DcuS. Aus dem Vektor kann DcuS₄₋₃₂₆ als GST-Fusionsprotein überproduziert werden. Die Überexpression des Fusionsproteins erfolgt in diesem System durch einen durch mit IPTG induzierbaren Promotor.

Die Expressionsplasmide wurden durch Sequenzierung überprüft.

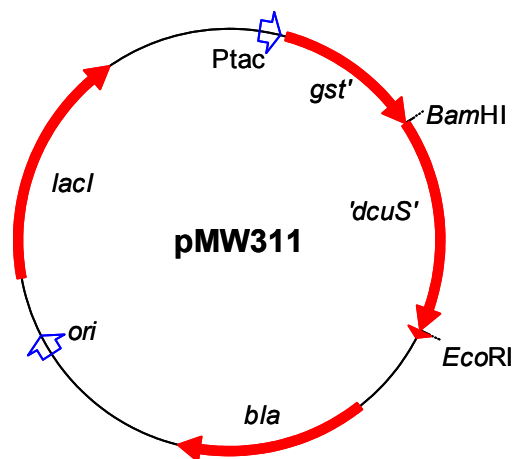


Abb. 4: Eigenschaften des Expressionsplasmids pMW311. Die Expression des DcuS-GST-Fusionsproteins steht unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors (Ptac).

Mutagenese von DcuS

Zur Konstruktion von Punktmutanten von DcuS wurde das Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Mittels zweier komplementärer Primer wurde die Nukleinsäuresequenz von *dcuS* so verändert, dass einzelne Aminosäuren ausgetauscht wurden. Die Mutationen von DcuS wurden im Überexpressionsplasmid pMW151 (Abb. 5) durchgeführt, so dass die resultierenden Proteine überproduziert werden konnten.

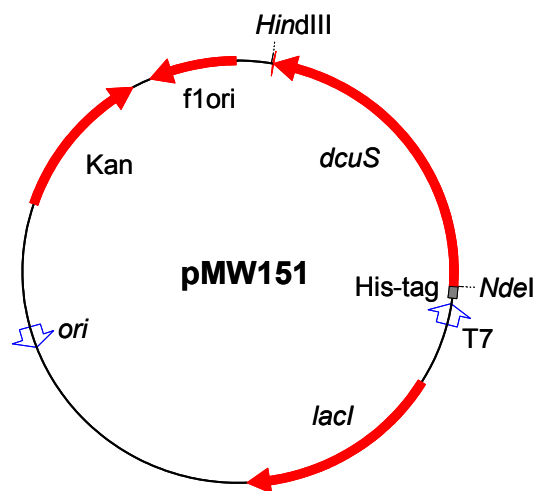


Abb. 5: Eigenschaften des Überexpressionsplasmids pMW151. Das Gen *dcuS* steht unter der Kontrolle eines induzierbaren T7 Promotors (T7), 5'-terminal schließt sich die DNA-Sequenz für einen His-tag an (schwarze Box).

Cysteinmutagenese von DcuS (Tab. 3)

Die natürlich in DcuS vorkommenden Cysteine C199 und C471 wurden schrittweise gegen Serine ausgetauscht. Auf Basis der daraus resultierenden cysteinlosen DcuS-Mutante wurden mehrere Varianten von DcuS konstruiert, die jeweils nur ein Cystein in der periplasmatischen Domäne besaßen. Dazu wurden die Serine S45, S80 und S179 gegen Cysteine ausgetauscht.

Faktor X_a-Mutagenese (Tab. 3)

Zur Konstruktion von DcuS-Mutanten mit einer eingeführten Faktor X_a Proteaseschnittstelle wurden kurze Sequenzabschnitte von *dcuS* in die Erkennungssequenz der Protease umgewandelt. Faktor X_a Protease erkennt die AS-Tetramere IDGR und IEGR und schneidet diese Sequenz nach der letzten Aminosäure.

Tab. 3: Oligonukleotide für die Mutagenese von *dcuS* (MWG Biotech, Ebersberg, HPSF gereinigt)

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]
Cysteinmutagenese		
S45C_nc	CTTCTCGCAAATCTGTGATATGACGC	63.2
S45C_cn	GCGTCATATCACAGATTTGCGAGAAG	63.2
S80C_nc	GAAAAAACCGCAGGAGTGTGGCATC	64.4
S80C_cn	GATGCCCACTCCTGCGGTTTTTTC	64.4
S179C_nc	GATCAATGACTGTCGCTGGAGCATTATC	65.1
S179C_cn	GATAATGCTCCAGCGACAGTCATTGATC	65.1
C199S_nc	CTGATTGGCACCAGCATTCTGGTTAAGG	66.6
C199S_cn	CCTTAACCAGAATGCTGGTGCCAATCAG	66.6
C471S_nc	GGCTGGCTGCACAGTGAAGTTAATGATG	66.6
C471S_cn	CATCATTAACCTCACTGTGCAGCCAGCC	66.6
Faktor X _a -Mutagenese		
Xa1Ksp_nc	GTTGCAGTCTATCATAGAAGGCCGCGTTAACGTGGACGATC >75 G	
Xa1Ksp_cn	CCGCGATCGTCCACGTTAACGCGGCCTTCTATGATAGACTG >75 CAAC	
Xa2Aat_nc	CGTCGTTGCCATCGACGAGCGCGGAGACGTCACGCTGATCA >75 AC	
Xa2Aat_cn	GTTGATCAGCGTGACGTCTCCGCGCTCGTCGATGGCAACGA >75 CG	
Xa3Mun_nc	GTCACGCTGATCGACGGTCGCGCACAACAATTGCTGAATTA >75 C	
Xa3Mun_cn	GTAATTCAGCAATTGTTGTGCGCGACCGTCGATCAGCGTGA >75 C	
DcuSXa4fwd	GATTACGATTGAAGGCCGGCTATTACTGATCAAC	68.3
DcuSXa4rev	GTTGATCAGTAATAGCCGGCCTTCAATCGTAATC	68.3
DcuSXa5fwd	GTATAGGCGTTATCGACGGTCGCATTTC AACC	69.5
DcuSXa5rev	GGTTGAAATGCGACCGTCGATAACGCCATTAC	69.5
DcuSXa6fwd	CTGATGCAGCGAATCGACGGTCGGGTCAACTATGC	74.2
DcuSXa6rev	GCATAGTTGACCCGACCGTCGATTCGCTGCATCAG	74.2
DcuSXA7fwd	GAAGTGTTAATCGACGGTAGACCGCGCCGC	72.2
DcuSXA7rev	GCGGCGCGGTCTACCGTCGATTAACACTTC	72.2

3.4. Biochemische Methoden

Überproduktion und Aufreinigung von His₆-DcuS

Für die Überproduktion der verschiedenen Mutanten von DcuS wurde das entsprechende Plasmid in *E. coli* C43 transformiert. Die Zellen wurden in LB-Medium + 55,4 ml/l 2 M Glucose gezüchtet. Dazu wurden 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet, die mit 20 % des Maximalvolumens befüllt wurden. Die Inkubation erfolgte aerob bei 30°C. Bei einer OD_{578nm} von 0,6 – 0,8 erfolgte die Induktion der Überexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Roth). Nach weiteren 3 h Inkubation war eine OD_{578nm} von > 2 erreicht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min bei 6000 Upm, Beckman JA-10 Rotor, 4°C) geerntet. Das Pellet wurde in Puffer 1 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 20 ml Puffer 1 resuspendiert. Die Zellen wurden in 3 Durchgängen bei 1200 Psi in der French Presse aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min bei 10.000 Upm, FiberLite F21B Rotor, 4°C) abgetrennt. Vom Überstand wurde durch Ultrazentrifugation (Kontron TFT70.38 Rotor, 200.000 x g, 65 min, 4°C, Beckman Coulter Optima LE-80K) die Membranfraktion erhalten. Die Membranen wurden in 2 Durchgängen mit 1 mM TrisHCl pH 7,7, 3 mM EDTA gewaschen und in Puffer 2 im Potter S (Braun, Melsungen) homogenisiert. Hierzu wurde das Nassgewicht der Membranen bestimmt und pro g Membran 10 ml Puffer 2 verwendet.

Zur Solubilisierung der Membranproteine wurde der Membranfraktion stufenweise Empigen BB (N,N-Dimethyl-N-dodecylglycin-betain, 35 % in H₂O, Fluka) bis zu einer Endkonzentration von 2 % zugegeben. Die Solubilisierung erfolgte für 1 h unter ständigem Rühren auf Eis. Alternativ wurde die Solubilisierung direkt während der Homogenisierung im Potter und unter anschließender Inkubation für 30 min auf Eis durchgeführt. Die Suspension wurde bei 300.000 x g für 50 min zentrifugiert, um nicht solubilierte Anteile abzutrennen. Die so erhaltene gelöste Membranfraktion wurde in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert oder konnte direkt weiterverwendet werden.

Der Überstand mit gelöstem His₆-DcuS wurde mittels Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Säule (Qiagen) gereinigt. Das Säulenvolumen betrug 2 ml. Zur Aufreinigung wurde ein Chromatographiesystem (Econosystem, BioRad) verwendet. Die Säule wurde mit 25 Volumina Puffer 3 äquilibriert. Anschließend wurden die solubilierten Membranen mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde mit 15 Volumina Puffer 3 (1 ml/min) gewaschen. Die Effektivität des Waschschrtes wurde über die UV-Absorption bei 280 nm

überwacht. Das gebundene Protein wurde mit 10 ml Puffer 4 eluiert und in Fraktionen zu je 1 ml gesammelt.

Puffer 1

50 mM TrisHCl pH 7,7
10 mM MgCl₂

Puffer 2

50 mM TrisHCl pH 7,7
0,5 M NaCl
10 % Glycerin
10 mM Imidazol

Puffer 3

50 mM TrisHCl pH 7,7
0,5 M NaCl
10 % Glycerin
20 mM Imidazol
0,04 % LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid-Lösung, 30 %, Fluka)

Puffer 4

wie Puffer 3 aber mit 500 mM Imidazol

Proteinreinigung von His₆-DcuS-PD/PAS

Für die Isolierung von ¹⁵N- bzw. ¹³C¹⁵N-markiertem DcuS-PD/PAS für die NMR-Messungen wurde das Plasmid pMW309 in *E. coli* C43 transformiert. Die Zellen wurden in isotopenhaltigem M9-Medium gezüchtet. Die Induktion und die Aufreinigung erfolgten wie für His₆-DcuS beschrieben.

Proteinreinigung von Gst-DcuS-PD/PAS

Für die Isolation GST-DcuS-PAS/PD erfolgte die Überexpression und Präparation der Membranfraktion wie für His₆-DcuS beschrieben. Die Affinitätschromatographie erfolgte mittels einer Glutathion-Sepharosematrix (Amersham Pharmacia Biotech). Das Säulenvolumen betrug 1,5 ml. Der Durchfluss wurde nur durch die Schwerkraft getrieben. Die Säule wurde mit 10 Volumina Puffer A (50 mM TrisHCl pH 7,6, 10 % Glycerin) äquilibriert. Danach wurde die Probe auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 Volumina Puffer B (50 mM TrisHCl pH 7,6, 200 mM NaCl, 10 % Glycerin) gewaschen. Zur Abspaltung des GST-Tags wurde das Fusionsprotein noch auf der Säule mit Thrombin-Protease (Amersham Pharmacia Biotech) (20 U / mg Protein) geschnitten. Dazu wurden 20 U Thrombin-Protease in 1 ml Puffer C (50 mM TrisHCl pH 7,6) gelöst, auf die verschlossene Säule gegeben, durchmischt und für 2 – 3 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde der

Durchfluss gesammelt und nochmals mit 1 ml Puffer C geschnittenes Protein von der Säule gewaschen. Nicht geschnittenes GST-DcuS-PD/PAS wurde mit GST-Elutionspuffer (50 mM TrisHCl pH 8, 100 mM reduziertes Glutathion) von der Säule eluiert.

Faktor X_a Proteaseverdau

Für den Faktor X_a Proteaseverdau der DcuS-Mutanten wurde das über die Affinitätschromatographie gereinigte Protein über Nacht gegen mindestens 100 Volumina Faktor X_a Schneidepuffer dialysiert. Die verwendeten Dialysemembranen (ZelluTrans, Roth) hatten eine Ausschlussgröße (MWCO, Molecular Weight Cut Off) von 10.000. Den dialysierten Proben wurde pro 100 µg DcuS 1 U Faktor X_a Protease (1 U/µl, Amersham Pharmacia Biotech) zugegeben und für 16 – 24 h bei 22°C inkubiert.

Faktor X _a Schneidepuffer	50 mM TrisHCl pH 7,7
	100 mM NaCl
	5 mM Imidazol
	1 mM CaCl ₂
	0,04 % LDAO

Nitroxid Spinmarkierung

Die Nitroxid Spinmarkierung der Cysteinmutanten von DcuS erfolgte am gereinigten Protein. Für die Markierung wurde Methanthiosulfonat Spinlabel (MTSSL, (1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat, Toronto Research Chemicals) verwendet. Das gereinigte Protein wurde über Nacht für 16 – 20 h mit 10 – 25-fachem molaren Überschuss an MTSSL (25 mM Stammlösung in 25 mM TrisHCl pH 7,7, 50 % Ethanol) inkubiert. Die Reaktion erfolgte bei 4°C unter leichtem Schütteln. Überschüssiges Markierungsreagenz wurde nach der Inkubation durch Dialyse gegen 200 – 500 Volumina Puffer (50 mM TrisHCl pH 7,7, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, 5 % Glycerin, 0,04 % LDAO) entfernt. Markiertes Protein wurde in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Quantifizierung freier Sulfhydrylgruppen

Zur Quantifizierung freier SH-Gruppen in DcuS wurde ein DTNB Test (Ellman, 1959) durchgeführt. Für den Test wurden in einer Quarzküvette 50 µl DTNB Stammlösung (50 mM Na-Acetat, 2 mM DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure), Ellman's Reagenz) in H₂O),

100 μ l 1 M TrisHCl pH 8 und H₂O vorgelegt und gemischt, so dass mit der Probe ein Endvolumen von 1 ml erreicht wurde. Der Ansatz ohne Zugabe der Probe diente als Referenz der Absorption bei 412 nm. Die Probe wurde dann dem Ansatz zugesetzt und die OD_{412nm} bestimmt. Freie Sulfhydrylgruppen wurden aus der Absorption der Probe gegen die Referenz über den Extinktionskoeffizienten von DTNB nach folgender Formel bestimmt:

$$[\text{SH}] = \text{OD}_{412\text{nm}} \times (\text{Gesamtvolumen} / \text{Probenvolumen}) / 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}.$$

Rekonstitution von DcuS

100 mg Phospholipide in 5 ml von *E. coli* (20 mg/ml *E. coli* Polar Lipid Extract, Avanti Polar Lipids) wurden im Rotationsverdampfer getrocknet und in 5 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 80 mg N-Octyl- β -D-Gluco-pyranosid (Gerbu) resuspendiert und gegen 3 x 1 Liter 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 dialysiert. Die Suspension wurde dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur langsam wieder aufgetaut. Die so vorbereiteten Phospholipide konnten für die Rekonstitution eingesetzt werden.

Für die Rekonstitution wurden Phospholipide mit Triton X-100 destabilisiert. Es wurde ein effektives Detergenz:Lipid Verhältnis (R_{eff}) von 1,3 oder 2,5 eingehalten (Rigaud *et al.*, 1988; Rigaud *et al.*, 1995). Die für die Destabilisierung verwendete totale Detergenzkonzentration (D_T) ergab sich nach Paternostre *et al.* (1988) aus

$$D_T = D_W + R_{\text{eff}} [\text{Lipid}]$$

D_W Konzentration des monomeren Detergenz in der wässrigen Phase
(0,18 mM für Triton X-100)

$[\text{Lipid}]$ Lipidkonzentration

Zu den destabilisierten Lipiden wurde die Proteinlösung zugegeben und für 10 min (R_{eff} 2,5) oder 1 h (R_{eff} 1,3) bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch inkubiert. Dabei wurde ein Lipid:Protein Verhältnis von 10:1 eingehalten. Zur Entfernung des Detergenz wurden Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad) verwendet (Holloway, 1973). Dazu wurden die Bio-Beads in 50 mM TrisHCl pH 7,7 aufgenommen und unter Rühren anaerobisiert, um Luftblasen zu entfernen. So vorbereitet wurden sie für maximal 2 Wochen gelagert. Pro mg Triton X-100 wurden 5 mg Bio-Beads zugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei 4°C auf dem Schütteltisch

inkubiert. Dann wurde nochmals die gleiche Menge an frischen Bio-Beads zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand mit der rekonstituierten Probe wurde von den Bio-Beads abgenommen, in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit Puffer aufgefüllt. Die Proteolipisomen wurden zentrifugiert (Kontron TFT70.38 Rotor, 300.000 x g, 50 min) und in zwei Durchgängen gewaschen. Die Pellets wurden in Puffer zu der gewünschten Konzentration aufgenommen und in 3 Zyklen in flüssigem N₂ schockgefroren und bei Raumtemperatur langsam wieder aufgetaut. Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur weiteren Verwendung.

Erfolgte die Rekonstitution in Gegenwart von Fumarat, wurden allen verwendeten Puffern 20 mM Fumarat zugesetzt.

Saccharose Dichtegradient

Zur Herstellung des Saccharose Dichtegradienten wurden Saccharoselösungen der Konzentrationen 5, 10, 20 und 45 % aus einer sterilfiltrierten Stammlösung (50 % in 50 mM TrisHCl pH 7,7) in 50 mM TrisHCl pH 7,7 frisch angesetzt. Für den diskontinuierlichen Stufengradienten wurden nacheinander die Saccharoselösungen in Schichten mit abnehmender Konzentration in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die verschiedenen Phasen nicht miteinander vermischen. Auf die 5 %ige Saccharosephase wurde abschließend ein Aliquot der Probe, aufgenommen in 50 mM TrisHCl pH 7,7, aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte bei 200.000 x g für 2 h (Kontron TFT70.38 Rotor) unter langsamer Beschleunigung und Abbremsung des Laufes.

EPR Messungen

Die EPR-Messungen erfolgten durch Dr. Olav Schiemann in der AG Prof. Prisner am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Frankfurt/Main.

NMR Messungen

Festkörper NMR-Messungen wurden in der Gruppe von Dr. Marc Baldus der Abteilung „NMR basierte Strukturbiologie“ von Prof. Griesinger am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt.

Messung der β -Galactosidaseaktivität

Die Messung der β -Galactosidaseaktivität wurde nach Miller (1992) durchgeführt. Bei anaerober Zucht wurden 5 ml Kulturvolumen angesetzt. Die Zellen wurden während der

exponentiellen Wachstumsphase bei einer $OD_{578\text{nm}}$ von 0,6 – 0,8 geerntet und unmittelbar gemessen. Es wurden dabei jeweils vier Parallelbestimmungen aus mindestens zwei unabhängigen Zuchten durchgeführt.

4. Ergebnisse

Unter anaeroben Bedingungen ist *E. coli* in der Lage Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor in der Fumaratatmung zu nutzen. Für die Aufnahme und Verwertung des Substrates werden der Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB und die Fumaratreduktase FrdABCD benötigt. Diese werden gezielt unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Fumarat gebildet. Die fumaratspezifische Induktion der beiden Systeme erfolgt durch das Zweikomponentensystem DcuSR (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999). Die Struktur der periplasmatischen Substratbindedomäne der Sensorkinase DcuS wurde aufgeklärt (Pappalardo *et al.*, 2003) und die Substratbindestelle identifiziert (Janausch, 2001).

Nach der genauen Charakterisierung der Substratbindedomäne sollte zum einen das Substratspektrum des Sensors DcuS näher untersucht werden und zum anderen die Funktion und die Struktur des in Phospholipidmembranen rekonstituierten Sensors aufgeklärt werden.

4.1. Substratspezifität von DcuS

DcuS erkennt ein breites Spektrum von C₄-Dicarbonsäuren als Substrate wie Fumarat, Succinat, Aspartat und Maleinat. Monocarbonsäuren wie Butyrat und Acetat hingegen werden nicht erkannt (Zientz *et al.*, 1998). Bei diesen Untersuchungen zur Substratspezifität wurde die maximale Induktion des DcuS-abhängigen *dcuB'*-*lacZ* Reportersystems gemessen. Zur genaueren Charakterisierung der Substratspezifität wurde getestet, in welchem Umfang die Abstände der Carbonsäuregruppen variiert werden können.

Für die Dicarbonsäuren Malonat (C₃), Glutarat (C₅) und Phthalat (1,3-Dicarboxybenzol, C₈) wurde die Induktion einer *dcuB'*-*lacZ* Reporterfusion im Stamm IMW237 gemessen. Die Zucht erfolgte anaerob in Mineralmedium mit 20 mM Glycerin und DMSO. Glycerin und DMSO ermöglichen anaerobes Wachstum, das dann nicht von den Dicarbonsäuren abhängt. Die C₄-Dicarbonsäuren dienen aber als Induktor der Reporterfusion *dcuB'*-*lacZ*. Der Effektor wurde in hoher Konzentration (50 mM) zugesetzt, um eine maximale Induktion zu erzielen. Malonat und Glutarat führten zu einer schwachen Induktion von *dcuB*, die lediglich um den Faktor 2 über der nichtinduzierten Expression lag (Tab. 4). Sie zeigen damit eine weit geringere Induktion als die C₄-Dicarboxylate, die die Expression um den Faktor 7-10 stimulieren. Die Dicarbonsäure Phthalat wurde ausgewählt, da ihre beiden Carboxylgruppen als Substituenten in Meta-Stellung (1,3) am Benzolring in guter Näherung der Struktur der C₄-Dicarbonsäure Maleinat entspricht. Im Gegensatz zu Maleinat wirkte Phthalat aber nicht

induzierend. Tab. 4 fasst die Ergebnisse aller Induktionsexperimente mit den C₄-Dicarbonsäuren und verwandten Verbindungen zusammen.

Tab. 4: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung der Substratspezifität von DcuS. Angegeben sind die maximale Induktion des Effektors, der apparente K_D-Wert und der Abstand der Carboxylgruppen im Effektormolekül. n. d.: nicht durchgeführt. Die K_D-Werte wurden wie in Abb. 5 gezeigt ermittelt.

Carbonsäure		Expression <i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> [MU]	Apparenter K _D	d [Å]
		IMW237	[mM]	Carboxylgruppen
	Keine	48	-	-
C ₂	Acetat	26	n.d.	-
C ₃	Malonat	89	13	2,5
C ₄	Butyrat	18	n.d.	-
	Fumarat	537	n.d.	3,8
	Succinat	437	3	3,8
	Malat	435	n.d.	3,8
	Tartrat	382	n.d.	3,8
	Aspartat	434	2	3,8
	Maleinat	337	2	3,1
C ₅	Glutarat	91	n.d.	4,9
C ₈	Phthalat	18	n.d.	n.d.

Um die Affinität von DcuS für verschiedene Effektoren zu ermitteln wurde die Expression von *dcuB* in Abhängigkeit der Konzentration der Effektoren bestimmt. Aus den Werten wurde der apparente K_D-Wert der Induktion bestimmt. Dieser entspricht der Konzentration des Effektors, bei der halbmaximale Induktion erfolgt. Einige Effektoren wie Fumarat und Malat werden von *E. coli* aufgenommen und umgesetzt. Die verwertbaren C₄-Dicarbonsäuren ändern damit die Konzentration und können für diese Messungen nicht eingesetzt werden. Deshalb konnte auf diese Weise nur der K_D-Wert von nicht verwertbaren Dicarbonsäuren getestet werden. Unter den anaeroben Zuchtbedingungen konnten für Succinat, Maleinat, Aspartat und Malonat die apparenten K_D-Werte ermittelt werden (Abb. 6 und Tab. 4). Die Affinität von starken Effektoren wie Succinat, Maleinat und Aspartat zeigte nur leichte Unterschiede mit apparenten K_D-Werten von 2 – 3 mM. Malonat dagegen, das nur eine geringe induktive Wirkung auf DcuS-abhängige Gene ausübt, zeigte mit einem apparenten K_D-Wert von 13 mM auch eine wesentlich niedrigere Affinität zu DcuS.

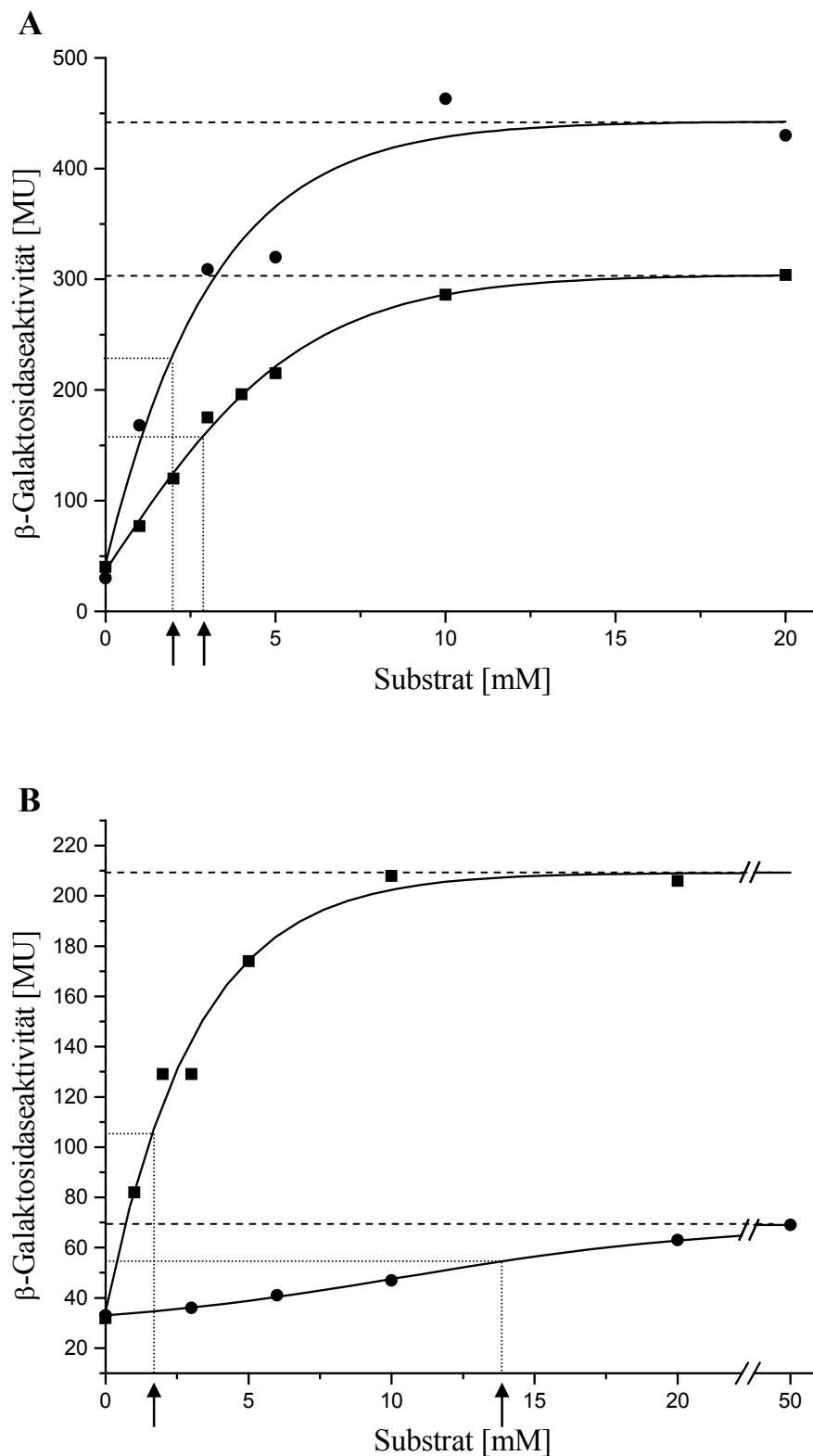


Abb. 6: Bestimmung der apparenten K_D -Werte der C_4 -Dicarbonsäuren Succinat, Maleinat, Aspartat und Malonat. Die Affinität von DcuS für die Substrate wurde *in vivo* mittels *dcuB*'-*lacZ* Expression bestimmt. Die Zucht erfolgte unter anaeroben Bedingungen in M9-Medium mit Glycerin, DMSO und den Effektoren in variabler Konzentration. (A) Bestimmung des apparenten K_D -Wertes für Maleinat (\bullet , 2 mM) und Succinat (\blacksquare , 3 mM), (B) für Aspartat (\blacksquare , 2 mM) und Malonat (\bullet , 13 mM). Die unterbrochene Linie gibt ungefähr die maximale Induktion an, die gepunktete Linie die halbmaximale Induktion und den apparenten K_D -Wert. Die Pfeile (\uparrow) geben die apparenten K_D -Werte an.

Für die getesteten Substrate wurde der Abstand (d) der C-Atome der Carboxylgruppen mithilfe des Programms ChemDraw ermittelt (Abb. 7). Dieser lag zwischen 2,5 Å für Malonat und 4,9 Å für Glutarat. Der Abstand für die C_4 -Dicarbonsäuren lag bei 3,1 Å für Maleinat (das cis-Isomer von Fumarat) und 3,8 Å für die restlichen Effektoren. Bei der Berechnung wurde für die ungesättigten C_4 -Dicarbonsäuren von der gestreckten Konformation der Moleküle ausgegangen. Aus dem Vergleich der Abstände der Carboxylgruppen mit den induktiven Eigenschaften der Effektoren wird ersichtlich, dass DcuS spezifisch solche Dicarbonsäuren erkennt, deren Carboxylgruppen sich in einem Abstand von 3,1 bis 3,8 Å voneinander befinden (Tab. 4). Weiter zeigt die fehlende Induktion der Dicarbonsäure Phthalat, dass auch die Größe möglicher Substituenten oder sonstige sterische Behinderungen an den Positionen C_2 und C_3 eine Rolle spielen.

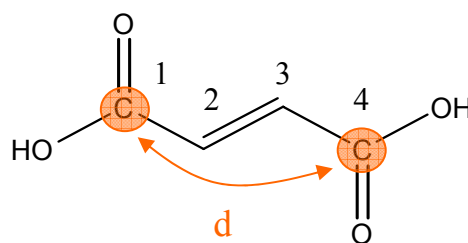


Abb. 7: Schematische Darstellung der Berechnung des Abstandes (d) der Carboxylgruppen am Beispiel von Fumarat.

4.2. Funktionsweise von DcuS in der Membran

DcuS ist eine im Aufbau für *E. coli* typische Histidin-Sensorkinase mit einer N-terminalen Input- oder Sensordomäne und einer C-terminalen Transmitterdomäne (Abb. 9). Die Inputdomäne besteht aus zwei Transmembranhelices, die die periplasmatische Sensordomäne umschließen und das Protein in der Membran verankern. Im cytoplasmatischen Teil schließen sich eine intrazelluläre PAS-Domäne und die Transmitterdomäne (Kinasedomäne) an. Diese enthält alle in Histidinkinasen konservierten Sequenzelemente (H-, N-, G1-, F- und G2-Boxen).

Histidinkinasen liegen in ihrem funktionellen Zustand vermutlich als Dimere oder auch höhere Multimere vor. Dies lassen biochemische Untersuchungen für verschiedene Systeme, unter anderem für die Histidinkinasen EnvZ (Yang and Inouye, 1991, Hidaka *et al.*, 1997), NtrB (Ninfa *et al.*, 1993) und KdpD (Heermann *et al.*, 1998), vermuten. Weiteren Aufschluss über die Funktionsweise erbrachten die Strukturaufklärung der Kinasedomäne des Osmosensors EnvZ (Tanaka *et al.*, 1998, Tomomori *et al.*, 1999) und CheA aus dem

Chemotaxisystem von *E. coli* (Bilwes *et al.* 1999). Die untersuchten Kinasedomänen wiesen α -helicale Bereiche auf, über die eine Dimerisierung erfolgte (Dutta *et al.*, 1999). Für EnvZ wurde aus experimentellen Daten ein Modell für die Funktionsweise als Dimer aufgestellt (Qin *et al.*, 2000, Cai *et al.*, 2003).

DcuS zeigt im Aufbau der Kinasedomäne die gleichen Kennzeichen wie die Kinasedomäne von EnvZ. Daraus wurde ein hypothetisches Modell der Funktionsweise von DcuS als Dimer in der Membran abgeleitet (Abb. 8). Die Gültigkeit dieses Modells sollte für DcuS mittels EPR (Electron Paramagnetic Resonance) nachgewiesen werden.

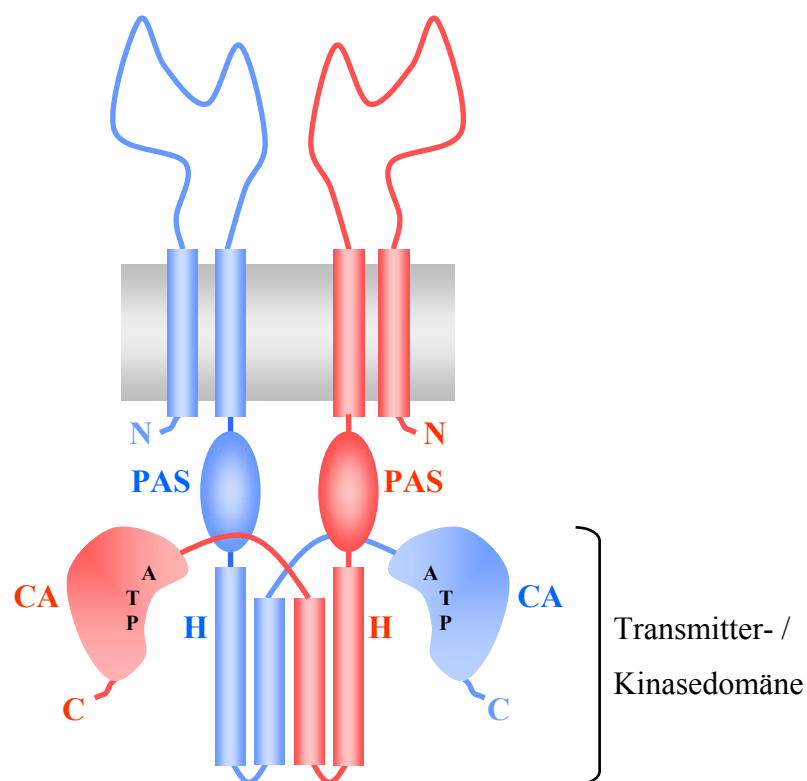


Abb. 8: Modell der Funktionsweise von DcuS als Dimer in der Membran. In dem Modell erfolgt die Dimerisierung der Kinasedomäne und damit von DcuS durch einen α -helicalen Bereich, die Phosphorylierung des konservierten Histidinrestes in *trans* durch die katalytische Domäne.

H: konserviertes Histidin, PAS: cytoplasmatische PAS Domäne, ATP: ATP Bindestelle, CA: katalytische ATP bindende Domäne.

EPR ist eine gebräuchliche Methode für die Untersuchung der Struktur oder von Konformationsänderungen in Proteinen (van Doorslaer and Schweiger, 2000). Bei der EPR wird der Übergang zwischen zwei Spinzuständen eines paramagnetischen Zentrums, z. B. eines ungepaarten Elektrons gemessen. Aus den Absorptionsspektren werden Informationen

über die Umgebung des Elektrons gewonnen. Kommen sich zwei ungepaarte Elektronen in räumliche Nähe, kann man Interaktionen und damit auch Abstände zwischen ihnen bestimmen. Da paramagnetische Zentren in Proteinen nur selten in Form von natürlichen Cofaktoren (Hämgruppen, Metallionen) oder in Übergangszuständen in Reaktionszentren (wie Radikale von Aminosäuren, Chromophoren und Cofaktoren) in Proteinen vorkommen, müssen sie in den meisten Fällen über spezielle Label in die Proteine eingebracht werden.

Die bisherigen Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand der Histidinkinasen wurden, mit Ausnahme chemischer Crosslinking-Experimente *in vivo*, hauptsächlich an detergentsolubilisiertem Protein oder mit isolierten Domänen durchgeführt. Diese Präparationsformen, z. B. Verwendung von Detergentien oder die Isolierung von Domänen, können einen entscheidenden Einfluss auf die Oligomerisierung haben. Es sollte ein System etabliert werden, mit dem EPR-Messungen an funktionellem DcuS und die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades in der Membran, d. h. *in situ* und unter funktionellen Bedingungen, möglich sind.

Cysteinmutagenese von DcuS

Für die EPR-Messungen von DcuS mussten Voraussetzungen für eine ortsspezifische Markierung des Proteins geschaffen werden. Die Markierung sollte über die Thiolgruppen von Cysteinen in DcuS erfolgen, welche an spezifischen Positionen in die periplasmatische Domäne mittels gerichteter Mutagenese eingebracht werden sollten. Da die Struktur der periplasmatischen Domäne bereits bekannt ist, wurden die Positionen so gewählt, dass aus den Abständen der Reste zueinander die Orientierung der Monomere von DcuS in der Membran abgeleitet werden kann.

DcuS besitzt in der Wildtypform zwei Cysteinreste (C199 und C471), welche gegen Serinreste ausgetauscht wurden, um eine cysteinfreie Mutante zu erhalten. In diese Mutante konnten dann die Cysteinreste für die Markierungsreaktionen in die gewünschte Position eingeführt werden. Für die Mutagenese wurden die Serinreste S45, S80 und S179 (Abb. 9) gewählt, die sich in unterschiedlichen Bereichen der Domäne befinden. S45 ist am N-Terminus der periplasmatischen Domäne lokalisiert, S179 am C-Terminus. Beide liegen in α -Helices, von denen angenommen wird, dass sie eine Verlängerung der Transmembranhelices 1 und 2 in die Substratbindedomäne darstellen. S80 befindet sich weiter in der periplasmatischen Domäne in guter räumlicher Trennung zu den anderen Resten (Abb. 10). Alle drei Reste befinden sich auf der Oberfläche der periplasmatischen Domäne, so dass sie eine gute Zugänglichkeit für den Spinlabel aufweisen sollten.

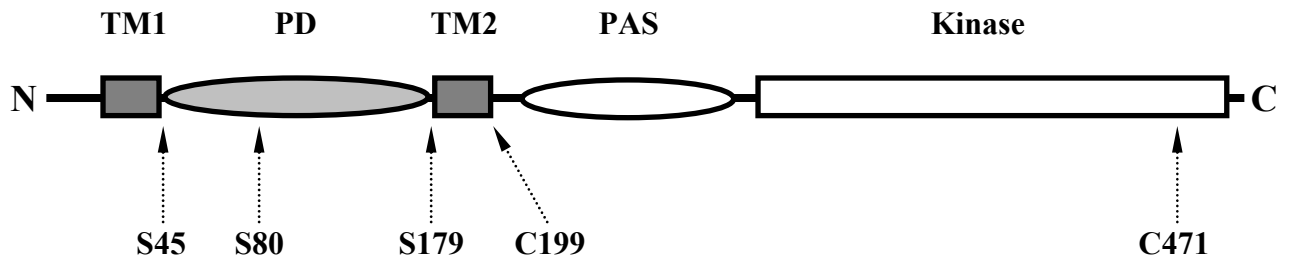


Abb. 9: Überblick über die Anordnung der verschiedenen Proteindomänen in DcuS (Wildtypform) und Lage der Reste in den Domänen, die mutiert werden sollten. TM1/TM2: Transmembranhelices 1 und 2, PD: periplasmatische Domäne, PAS: cytoplasmatische PAS Domäne, Kinase: Kinasedomäne (Transmitterdomäne).

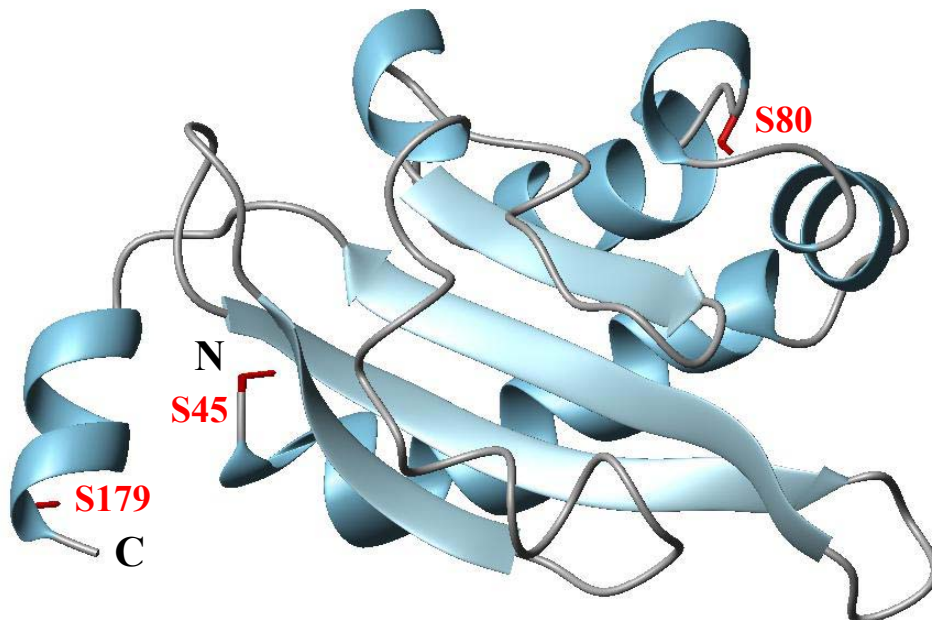


Abb. 10: 3D-Struktur der periplasmatischen Domäne von DcuS. Die Lage der Seitenketten der mutierten Serinreste ist hervorgehoben (rot). S45 und S179 befinden sich am N- bzw. C-Terminus, S80 in räumlichen Abstand in der Domäne.

Die gerichtete Mutagenese erfolgte im Expressionsplasmid pMW151 (Janausch, 2001). Dieses pET28a-Derivat enthält *dcuS* unter der Kontrolle eines induzierbaren T7 Promotors für die Überexpression. Aus der cysteinlosen DcuS-Mutante (Plasmid pMW336) konnten nun die Cysteinmutanten DcuS S45C* (pMW306), DcuS S80C* (pMW307) und DcuS S179C* (pMW308) hergestellt werden, die die gewünschten Cysteinreste für die EPR-Untersuchungen enthielten (Tab. 5). Jede mutierte Form von DcuS wurde durch Sequenzierung des kompletten *dcuS*-Gens überprüft.

Tab. 5: Übersicht über die Cysteinmutanten für die EPR

Plasmid	Mutation
pMW151	wt DcuS
pMW324	DcuS C199S
pMW325	DcuS C471S
pMW336	DcuS C199S C471S (Cys ⁻)
pMW306	DcuS S45C C199S C471S (DcuS S45C [*])
pMW307	DcuS S80C C199S C471S (DcuS S80C [*])
pMW308	DcuS S179C C199S C471S (DcuS S179C [*])

Funktionalitätstest der Cysteinmutanten

Um die Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf die Funktion von DcuS *in vivo* zu testen, wurde ein DcuS negativer Stamm mit den Plasmiden der Cysteinmutanten komplementiert. Dazu wurden die Plasmide in den Stamm IMW260 transformiert. IMW260 trägt eine chromosomale Deletion von *dcuS*, die durch ein plasmidcodiertes, funktionelles *dcuS* komplementiert werden sollte. Dies kann durch eine ebenfalls in IMW260 vorhandene *dcuB'*-*lacZ* Reporterfusion getestet werden.

Die Zucht erfolgte anaerob unter induzierenden Bedingungen in Mineralmedium mit Glycerin, DMSO und Fumarat als Induktor. Als Negativkontrolle diente der Stamm IMW260 ohne Plasmid, die Positivkontrolle bildete IMW260 + pMW151 das für Wildtyp-DcuS codiert. Die Messung erfolgte in zwei getrennten Ansätzen mit je 3 unterschiedlichen Cysteinmutanten und jeweils der Negativ- und Positivkontrolle (Abb. 11 A und B). In der $\Delta dcuS$ -Mutante fehlt die Induktion von *dcuB'*-*lacZ* vollständig. Sie kann mit *dcuS*⁺ auf dem Plasmid wiederhergestellt werden. Die *dcuS*-Mutanten, in denen die Wildtyp-Cysteinreste gegen Serin ersetzt wurden, zeigten in der Komplementation nur geringfügig erniedrigte Werte (Abb. 11 A). Die cysteinfreie Mutante besaß immer noch 80 % der Aktivität des Wildtyps. Wenn in dieser Mutante die Serinreste S45, S80 und S179 gegen Cysteinreste ausgetauscht wurden, änderten sich die *in vivo* Aktivitäten gegenüber der cysteinfreien Ausgangsmutante nicht weiter (Abb. 11 B). Dies zeigt, dass die cysteinfreie Mutante von DcuS und die Mutanten in S45C^{*}, S80C^{*} und S179C^{*} *in vivo* aktiv und für die geplanten Untersuchungen verwendbar sind.

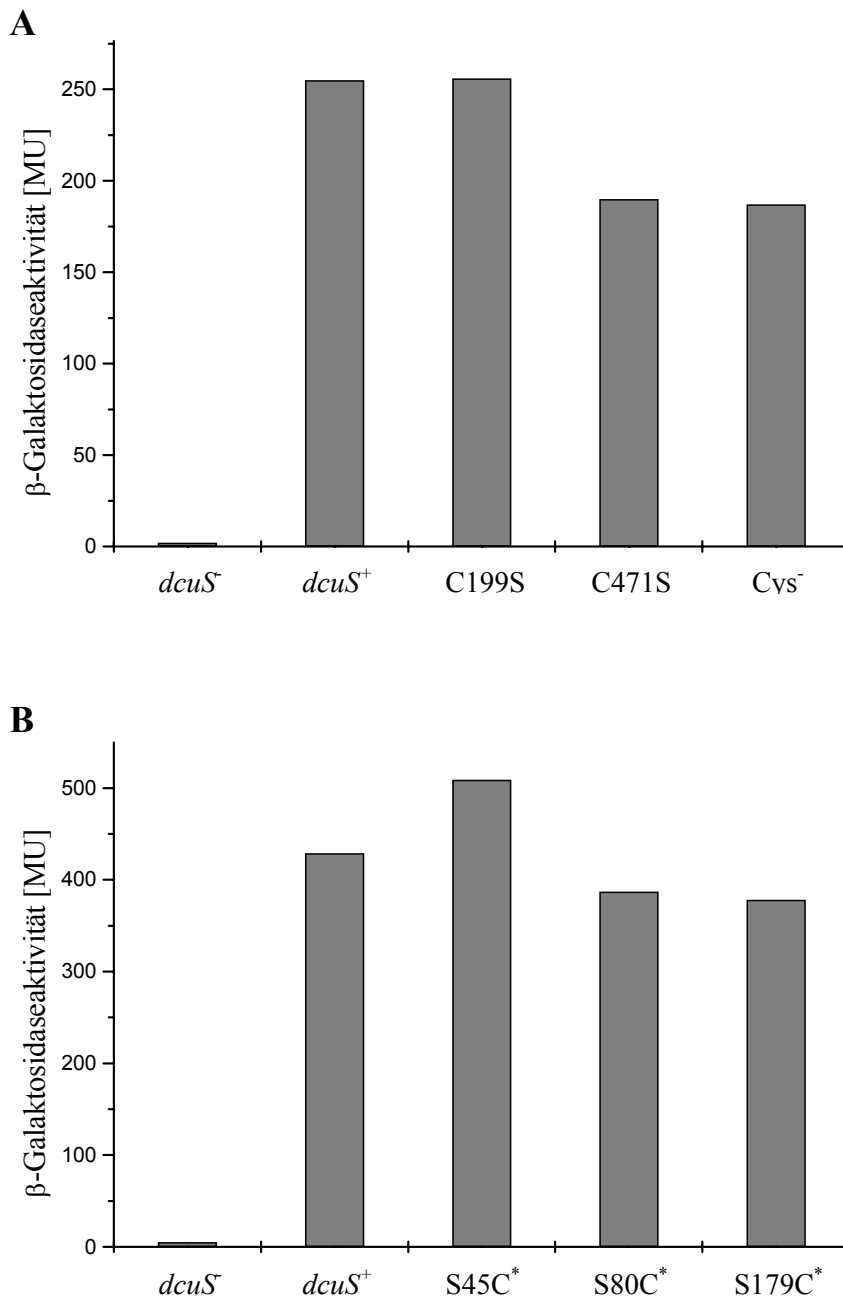


Abb. 11: Auswirkungen der Mutationen in *dcuS* auf die Expression von *dcuB*'-'*lacZ*. IMW260 (*dcuB*'-'*lacZ* und *dcuS*::*cam*^r) wurde mit plasmidcodiertem *dcuS* (pMW151) und den mutierten Derivaten *dcuS* C199S (pMW324), C471S (pMW325), Cys⁻ (pMW336), S45C^{*} (pMW306), S80C^{*} (pMW307) und S179C^{*} (pMW308) transformiert. Die Zucht erfolgte unter anaeroben Bedingungen in M9-Medium.

Überexpression und Reinigung der Cysteinmutanten von DcuS

Nachdem die Funktionalität der Cysteinmutanten *in vivo* nachgewiesen werden konnte, sollten diese nun in *E. coli* überproduziert und aufgereinigt werden. Hierfür wurden die

Cysteinmutanten DcuS S45C* (pMW306), DcuS S80C* (pMW307) und DcuS S179C* (pMW308) verwendet.

Die Synthese erfolgte unter Kontrolle des induzierbaren T7 Promotors der Expressionsplasmide und wurde durch die Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid) gestartet. Nach der Induktion der Expression war im SDS-Gel eine Proteinbande bei ca. 62 kD zu erkennen, die der erwarteten Größe von DcuS mit N-terminalem His-tag entsprach (Abb. 12).

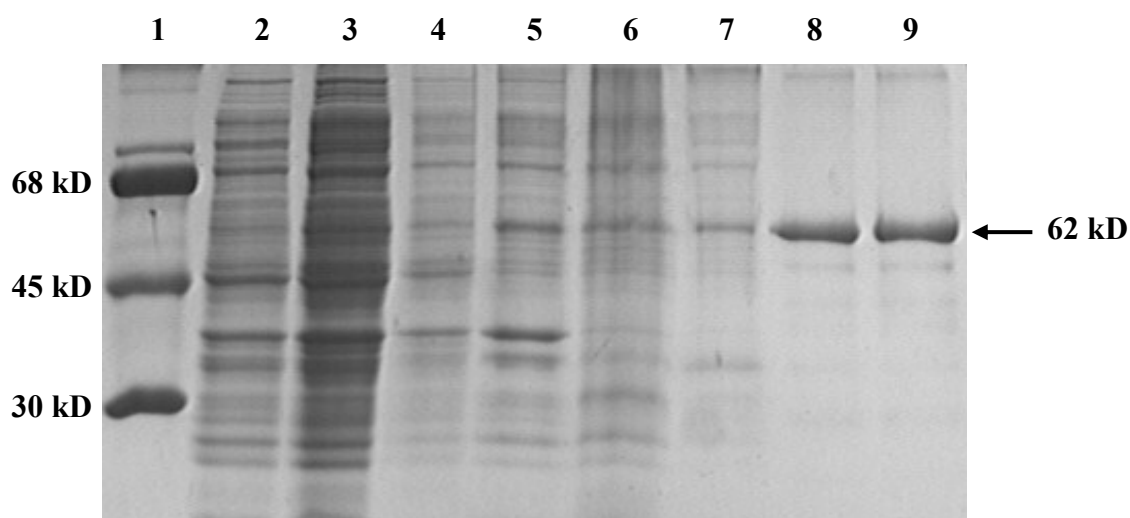


Abb. 12: Überexpression und Reinigung der Cysteinmutante DcuS S179C* (pMW308). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Spur:

1: Proteinstandard: BSA (M_r 68 kD), ovAlbumin (M_r 45 kD), Carboanhydrase (M_r 30 kD)	
2: Zellhomogenat vor der Induktion	15 μ g Protein
3: Zellhomogenat nach 3 h Induktion	25 μ g Protein
4: Gesamtprotein nach Zellaufschluss	5 μ g Protein
5: Membranfraktion	8 μ g Protein
6: Durchlauf der Ni-NTA-Agarosesäule	8 μ g Protein
7: Waschfraktion der Ni-NTA-Agarosesäule	5 μ g Protein
8: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 2	7 μ g Protein
9: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 3	7 μ g Protein

DcuS befand sich in der Membranfraktion und wurde daraus mit einem Detergenz solubilisiert. Zur Solubilisierung wurde das ionische Detergenz Empigen BB in einer Endkonzentration von 2 % verwendet. Die solubilisierete Membranfraktion wurde auf eine Ni²⁺-NTA-Säule aufgetragen. Verunreinigungen durch andere Membranproteine wurden durch einen Waschschriff entfernt und das gebundene Protein in Elutionspuffer mit 0,5 M Imidazol eluiert. Der Elutionspuffer enthielt als Detergenz 0,04 % LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid), so dass während der Affinitätschromatographie das Detergenz ausgetauscht wurde. In der Elutionsfraktion war gereinigtes DcuS enthalten, das

schätzungsweise mehr als 95 % des Proteins ausmachte (Abb. 12). Aus 100 mg Gesamtprotein konnten so 0,8 mg DcuS gereinigt werden (Tab. 6).

Tab. 6: Ausbeuten der Reinigung der Cysteinmutante DcuS S45C* (pMW306)

	Ausbeute (%)	Protein [mg] ^a
Gesamtprotein	100	2234
Lösliches Protein	67	1495
Membranprotein	26	577
Gereinigtes Protein	0,8	18

^a aus 2,4 l Kulturvolumen, Zucht mit *E. coli* C43 in LB + Glucose

Nitroxidmarkierung der Cysteinmutanten

Für die EPR-Messungen wurde das gereinigte Protein mit einem Nitroxid-Spinlabel markiert. Dieser trägt am Sauerstoff der Nitroxidgruppe ein ungepaartes Elektron, das durch EPR-Spektroskopie detektiert werden kann. Zur Markierung wurde Methanthiosulfonat-Spinlabel (MTSSL) verwendet. Die Sulfongruppe von MTSSL reagiert spezifisch mit der Thiolgruppe von Cystein. Aus der Reaktion resultiert eine kovalente Bindung über eine Disulfidbrücke, mit der das Nitroxid mit dem Protein verbunden wird (Abb. 13). MTSSL zeichnet sich vor allem durch seine geringe Größe aus. Diese entspricht in etwa der eines Tryptophanrestes und hat in der Regel keinen störenden Einfluss auf die Struktur des Proteins.

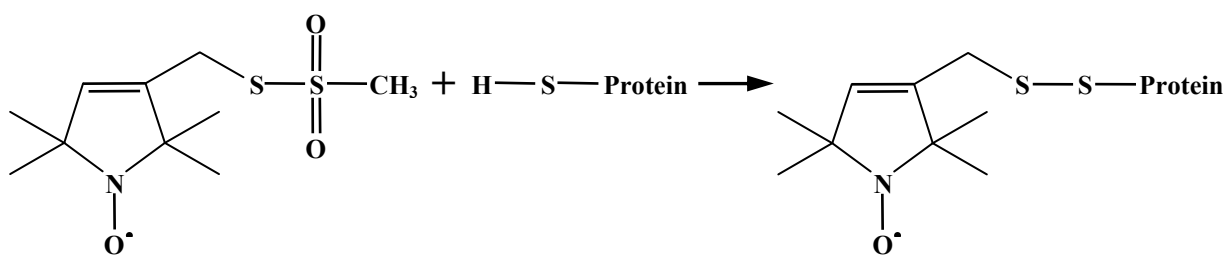


Abb. 13: Struktur des Nitroxid Spinlabels MTSSL und Reaktion mit Cystein. Das Reagenz wird über eine Disulfidbrücke kovalent an das Protein gebunden.

Die Markierungsreaktion erfolgte mit 25-fachem molarem Überschuss an MTSSL gegenüber dem Protein (Cystein). Nach Ablauf der Reaktion wurde freies, nicht gebundenes MTSSL durch intensive Dialyse aus der Proteinlösung entfernt (Wegener *et al.*, 2000). Zur Bestimmung des Markierungsgrades des Proteins wurden mit DTNB freie Sulfhydrylgruppen, d. h. DcuS mit nicht markierten Cysteinresten, detektiert. Der Markierungsgrad lag bei mehr als 80 %, was für die EPR-Messungen ausreichend war.

Rekonstitution der spinmarkierten Cysteinmutanten von DcuS in Liposomen

Um funktionelles DcuS *in vitro* zu analysieren, muss das Protein in Membranen rekonstituiert werden. Mit der Rekonstitution werden *in vitro* für das Protein ähnliche Bedingungen wie *in vivo* in der Zellmembran geschaffen. Mit einem Phospholipidgemisch aus *E. coli* wurden zunächst Liposomen hergestellt. Dazu wurden die Phospholipide in einer konzentrierten Octylglycosidlösung gelöst und dieses langsam durch Dialyse gegen detergentfreien Puffer wieder entfernt. Im Laufe dieses Prozesses lagern sich die Phospholipide spontan zu Membranen zusammen. Die anschließende Rekonstitution erfolgte durch Inkubation der Liposomen mit dem Detergenz Triton X-100. Triton X-100 bewirkte eine Destabilisierung der Membranen und ermöglichte auf diese Weise den Einbau des Proteins. Zu den destabilisierten Liposomen erfolgte die Zugabe des gereinigten, detergentgelösten und nitroxidmarkierten Proteins. Anschließend wurde das Detergenz mit Bio Beads (Holloway, 1973) langsam entfernt. Die Rekonstitution wurde mit einem Verhältnis Protein:Lipid von 1:10 (w/w) durchgeführt, was einem Proteinmolekül auf ca. 650 Lipidmolekülen entsprach. Wenn der Abstand freier Monomere $> 50 \text{ \AA}$ ist, liefern diese bei EPR-Messungen kein Signal. Aus dem Protein/Lipid-Verhältnis kann berechnet werden, welche Fläche einem einzelnen monomeren DcuS in einer Lipiddoppelschicht zur Verfügung steht (Armen *et al.*, 1998). Bei dem Verhältnis Protein/Lipid von 1:650 (mol/mol) ergibt sich so ein Abstand von mehr als 50 \AA zwischen den DcuS-Molekülen unter der Annahme, dass alles DcuS als Monomer vorliegt und gleichmäßig in die Liposomen eingebaut wird (Abb. 14).

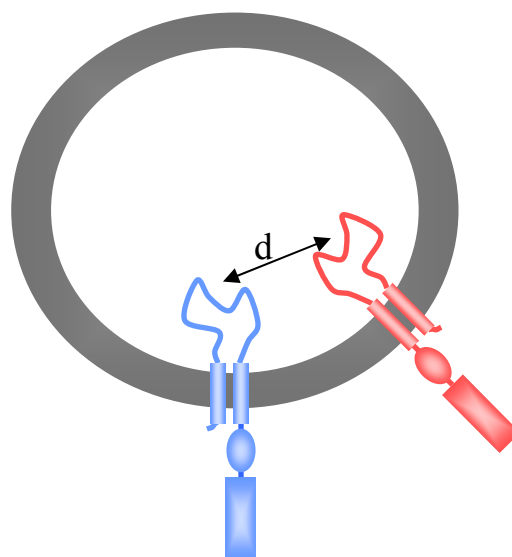


Abb. 14: Modell der Rekonstitution der Cysteinmutanten in Liposomen. d: Abstand freier Monomere. Orientierung von DcuS nach Jausch *et al.* (2002).

EPR Spektroskopie der Cysteinmutanten von DcuS

Für die EPR wurden die drei Cysteinmutanten nitroxidmarkiert in löslicher und in mindestens einer rekonstituierten Form bereitgestellt (Abb. 15). EPR-Messungen, aus denen Hinweise auf den Zustand von DcuS in der Membran erhalten werden konnten, wurden bisher mit der Cysteinmutante DcuS S80C* durchgeführt. Es wurden Spektren von vier unterschiedlich behandelten Proben des Proteins DcuS S80C* aufgenommen. Dies waren in Detergenz gelöstes DcuS und drei Proben, die in unterschiedlicher Form rekonstituiert wurden. Die lösliche Probe wurde durch Konzentrieren des markierten Proteins durch Zentrifugation in Vivaspin-Konzentratorröhrchen (Vivascience) gewonnen, und war in Puffer mit 10 % Glycerin gelöst. Die drei rekonstituierten Proben unterschieden sich in den Rekonstitutionsbedingungen. Zwei Proben wurden unter normalen Bedingungen rekonstituiert, die dritte Probe jedoch in Anwesenheit von Fumarat als Effektor.

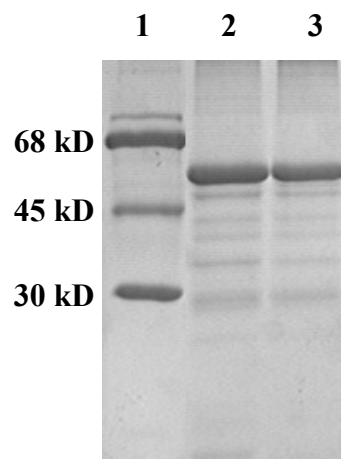


Abb. 15: Nitroxidmarkierte Proben der Cysteinmutante DcuS S179C*. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Spur:

- | | |
|---------------------------------|---------------|
| 1: Proteinstandard | |
| 2: lösliches DcuS S179C* | 12 µg Protein |
| 3: rekonstituiertes DcuS S179C* | 10 µg Protein |

Deutliche Unterschiede zwischen der löslichen und den rekonstituierten Proben wies das Field Sweep Spektrum (Abb. 16) auf. Bei diesem Spektrum wurde die Absorption nach Anregung mit einem Mikrowellenpuls in Abhängigkeit der Magnetfeldstärke aufgenommen. Es entspricht damit dem Absorptionsspektrum einer CW-EPR Messung (Continuous Wave). Die rekonstituierten Proben verhielten sich untereinander identisch, die lösliche Probe zeigte dagegen ein im Vergleich dazu verbreitertes Absorptionsspektrum.

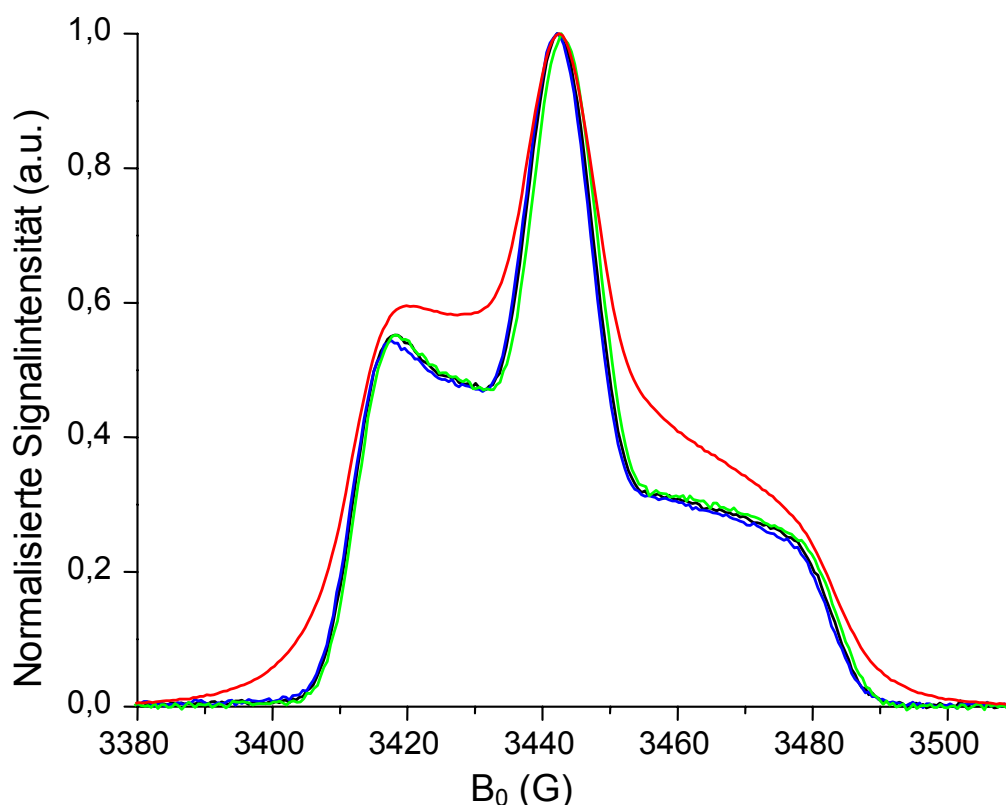


Abb. 16: Field Sweep Spektrum von DcuS S80C*. Dargestellt sind die Absorptionsspektren der löslichen (rot) und der rekonstituierten Proben (blau, grün und schwarz) in Abhängigkeit der Stärke des Magnetfeldes. Auf der X-Achse ist die Stärke des äußeren Magnetfeldes B_0 in Gauss aufgetragen, auf der Y-Achse die auf das Absorptionsminimum und -maximum normalisierte Signalintensität (a.u. arbitrary units).

Die Abstände zwischen den Nitroxid-Spinlabeln in den DcuS-Monomeren wurden mit einem 4-Puls-ELDOR (ELectron DOuble Resonance) Experiment bestimmt (Abb. 17). Bei dieser Methode wird durch verschiedene Mikrowellenpulse ein Elektronenspincho erzeugt. Aus dem Zerfall des Echos kann auf die Abstände der eingebrachten ungepaarten Elektronen der Nitroxide geschlossen werden. Kommen sie sich in räumliche Nähe $\leq 50 \text{ \AA}$, führen die Wechselwirkungen zwischen ihnen zu einem veränderten Echozerfall, im Idealfall zu einer Oszillation.

Die rekonstituierten Proben von DcuS S80C* zeigen einen deutlich veränderten Echozerfall gegenüber dem gelösten DcuS S80C* (Abb. 17). In der löslichen Probe verlief der Zerfall in einer flacheren Kurve. Keine der Proben wies allerdings die Oszillation einer Wechselwirkung zwischen den Nitroxiden im Echozerfall auf.

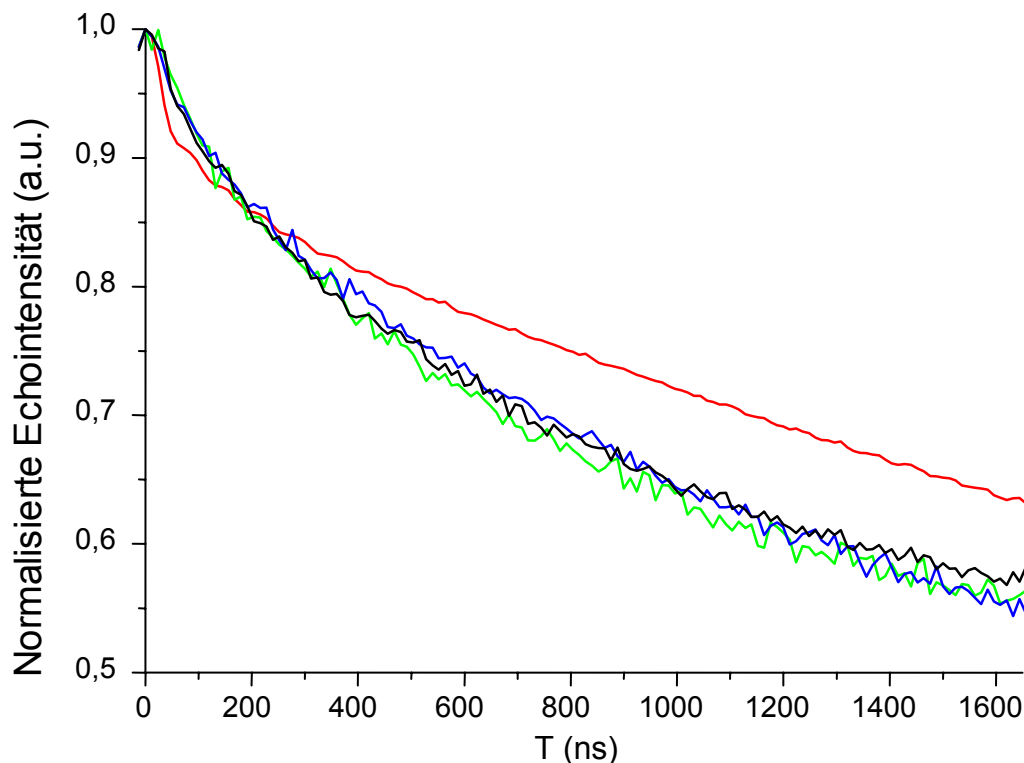


Abb. 17: 4-Puls-ELDOR Spektrum von DcuS S80C*. Dargestellt ist der Zerfall des durch die Mikrowellenpulssequenz stimulierten Elektronenspinechos der löslichen (rot) und rekonstituierten Proben (blau, grün und schwarz). Auf der X-Achse ist die Zeit T aufgetragen, auf der Y-Achse die auf das maximale Signal normalisierte Signalintensität (a.u. arbitrary units).

Die Art des Echozerfalls im PELDOR-Spektrum und der verbreiterte Peak im Field-Sweep-Spektrum wiesen beide auf eine sehr breite Abstandsverteilung der Nitroxide der löslichen DcuS-Probe hin. Bei den rekonstituierten Proben sprachen der Echozerfall und der schmale Peak des Field Sweep Spektrums dagegen dafür, dass in diesen Proben diskrete Abstände zwischen den Nitroxiden vorherrschten.

Der Echozerfall des PELDOR Spektrums konnte für eine Abstandstransformation genutzt werden (Abb. 18). Dabei wird aus dem Echozerfall der Abstand der Nitroxide berechnet. Dies lieferte eine sehr breite Abstandsverteilung für die lösliche Probe ohne distinkte Abstände zwischen den Nitroxiden, was auf eine eher zufällige Abstandsverteilung und Aggregation des Proteins hindeutete (Abb. 18 A). Die Präparation besteht damit aus einem Gemisch teilaggregierter und gelöster DcuS-Monomere.

Die Transformation für die rekonstituierten Proben resultierte in einem dominierenden diskreten Abstand der Nitroxide von ca. 41 Å und einem weiteren schwächeren Peak bei ca. 25 Å (Abb. 18 B). Dies lieferte erste Hinweise auf den Aggregations- oder

Oligomerisierungszustand von DcuS in der Membran und zeigt, dass zumindest der größere Teil des rekonstituierten DcuS in einer definierten Form vorliegt.

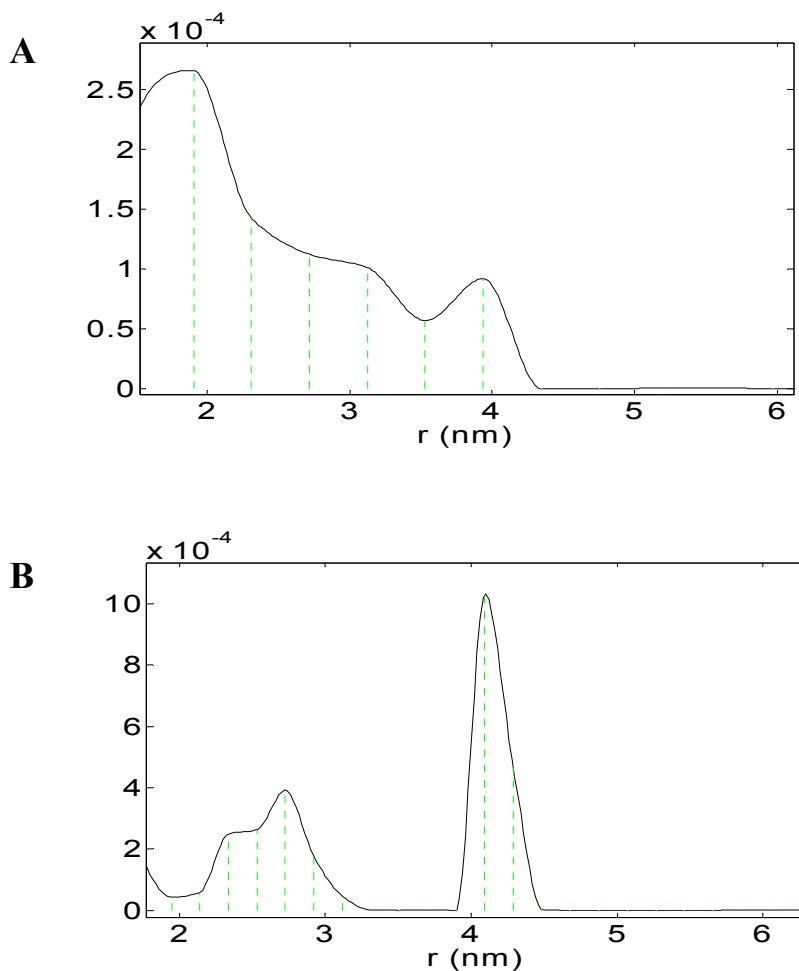


Abb. 18: Abstandstransformation der Nitroxid-Spinlabel aus dem PELDOR Spektrum für die lösliche (A) und die rekonstituierten Proben (B) von DcuS S80C^{*}. Für die lösliche Probe ergab sich eine breite Abstandsverteilung ohne ausgezeichnete Maxima. Die rekonstituierten Proben zeigten eine identische Abstandsverteilung mit einem deutlichen Maximum bei ca. 41 Å und einem weiteren bei ca. 25 Å. Auf der X-Achse ist der Abstand r der Nitroxide aufgetragen, auf der Y-Achse die relative Verteilung.

4.3. Strukturuntersuchungen von DcuS in der Membran

Mit der Strukturaufklärung der periplasmatischen Domäne von DcuS durch NMR (Pappalardo *et al.*, 2003) konnten die Erkenntnisse über die Arbeitsweise von DcuS vertieft werden. Ergebnisse aus Untersuchungen zu den an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren durch Mutagenese (Janausch, 2001; Kneuper *et al.*, 2005) konnten in einen strukturellen Kontext übersetzt werden und resultierten in der Lokalisation der möglichen Substratbindestelle der periplasmatischen Domäne. Die Beschränkung der erhaltenen Strukturinformationen auf die lösliche periplasmatische Domäne setzt der detaillierten Aufklärung der Funktionsweise von DcuS allerdings Grenzen. So sind aus der bisher ermittelten Struktur keine Aussagen über die Weiterleitung des extracellulär empfangenen Signals über die Membran auf die cytoplasmatische Transmitterdomäne möglich. Die Strukturaufklärung von DcuS in der Membran als weiteres Ziel sollte wesentlich zu einem umfangreichen Modell der Funktionsweise von DcuS beitragen.

Die Strukturaufklärung sollte durch Festkörper-NMR erfolgen, bei der im Gegensatz zur herkömmlichen NMR an löslichen Proteinen, Untersuchungen an Membranproteinen im nativen Zustand in der Membran möglich sind (de Groot, 2000). Da die Festkörper NMR zur Zeit noch nicht effektiv für Proteine wie DcuS mit einer Größe von ca. 63 kD eingesetzt werden kann, musste eine verkürzte Variante von DcuS hergestellt werden. Diese sollte stabil in großen Mengen überproduziert und in Membrane rekonstituiert werden können.

Es wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt, um C-terminal verkürztes DcuS bereitzustellen. Ein Ansatz befasste sich mit der Einführung einer Proteaseschnittstelle in DcuS um den C-terminalen Bereich von DcuS abzutrennen und selektiv das gewünschte N-terminale Fragment zu gewinnen. Parallel dazu wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, in dem ein verkürztes *dcuS*-Fragment direkt in einen Expressionsvektor kloniert und überproduziert wurde.

Konstruktion der Proteasemutanten von DcuS

Als Protease für die Herstellung von C-terminal verkürztem DcuS wurde Faktor X_a Protease ausgewählt. Faktor X_a erkennt spezifisch die Aminosäuresequenzen IDGR und IEGR und schneidet das Protein nach der letzten Aminosäure der Erkennungssequenz. DcuS besitzt keine natürlich vorkommenden Schnittstellen für diese Protease, so dass die Erkennungssequenz über gerichtete Mutagenese in *dcuS* eingebracht werden konnten. Die Mutagenese erfolgte im Expressionsplasmid pMW151, modifiziertes DcuS konnte somit

sofort überproduziert werden. Es wurden insgesamt 7 verschiedene Mutagenesen durchgeführt, die in den DcuS-Varianten DcuS X_a1 – DcuS X_a7 resultierten (Abb. 19 B). Die Proteaseschnittstellen wurden dabei so eingeführt, dass nach Spaltung Konstrukte mit oder ohne PAS-Domäne erhalten werden sollten (Abb. 19 A). DcuS X_a1 – DcuS X_a7 unterschieden sich in der Größe der nach dem Proteaseverdau erwarteten Proteinfragmente (Tab. 8).

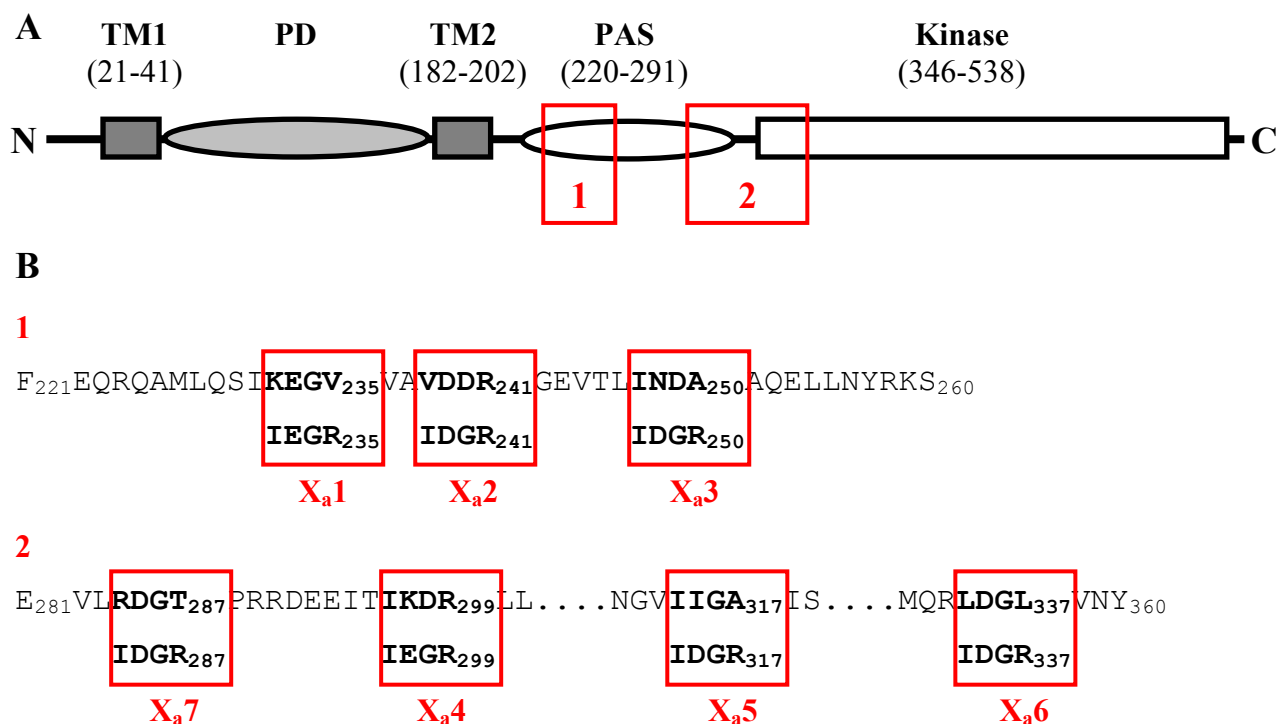


Abb. 19: Überblick über die Lage der Faktor X_a Schnittstellen in der Domänenstruktur von DcuS (A). Die Schnittstellen wurden in zwei Gruppen im N-terminalen Bereich der cytoplasmatischen PAS Domäne (1) und in einem größeren Bereich zwischen dem Ende der PAS Domäne und dem Beginn der Kinasedomäne eingeführt (2). In Klammern sind die Positionen (AS) der Domänengrenzen nach der SwissProt Datenbank angegeben. (B) Aminosäuresequenz von DcuS und genaue Lage der Faktor X_a Schnittstellen. Die veränderte Sequenz ist unter der Originalsequenz dargestellt. Das Subskript gibt die Position an, nach der die Protease die Zielsequenz IEGR oder IDGR schneidet.

Die Überexpression in *E. coli* wurde für alle Konstrukte mit eingebauter Schnittstelle positiv getestet und die entsprechenden Proteine in voller Länge konnten mit guter Ausbeute über Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Zugänglichkeit der Schnittstelle wurde nach intensiver Dialyse der aufgereinigten Proteine durch Verdau mit Faktor X_a überprüft. Dabei zeigten sich für die verschiedenen Varianten eine unterschiedliche Zugänglichkeit für die Protease (Abb. 20 und 21). DcuS X_a2, X_a4, X_a6 und X_a7 konnten nicht oder nur in geringem Ausmaß geschnitten werden (Abb. 21). Von DcuS X_a5 konnten bis zu 50 % des eingesetzten Proteins geschnitten werden. Die besten Zugänglichkeiten zeigten DcuS X_a1 und DcuS X_a3, bei denen nahezu das gesamte Protein geschnitten wurde (Abb. 20).

Tab. 7: Übersicht über die Proteasemutanten von DcuS

Plasmid	Proteasemutante	N-terminales Fragment		C-terminales Fragment	
		Aminosäuren	M _r [kD]	Aminosäuren	M _r [kD]
pMW247	DcuS X _a 1	1-235	28,7	236-543	34,1
pMW248	DcuS X _a 2	1-241	29,2	242-543	33,4
pMW249	DcuS X _a 3	1-250	30,2	251-543	32,5
pMW326	DcuS X _a 4	1-299	35,9	300-543	26,8
pMW327	DcuS X _a 5	1-317	37,8	318-543	25
pMW328	DcuS X _a 6	1-337	40,2	338-543	22,6
pMW329	DcuS X _a 7	1-287	34,4	288-543	28,3

Nach der Spaltung des isolierten Proteins sollte die selektive Aufreinigung der N-terminalen Fragmente mit einem weiteren Reinigungsschritt über eine Ni-NTA-Säule vorgenommen werden. Dies war ohne Zwischenschritte möglich, da die hohe Imidazolkonzentration der gereinigten Proteinfractionen durch den Dialyseschritt vor dem Proteaseverdau bereits stark erniedrigt worden war. Der weitere Reinigungsschritt erwies sich bei DcuS X_a1 und DcuS X_a3 jedoch als nicht erfolgreich. Es wurden sowohl im Durchlauf durch die Ni-NTA-Säule als auch in der Elutionsfraktion das N-terminale und das C-terminale Fragment wiedergefunden (Abb. 20, Spuren 6 und 7). Die beiden Fragmente von DcuS X_a5 konnten dagegen erfolgreich chromatographisch getrennt werden. Diese DcuS-Variante wurde allerdings nur unvollständig geschnitten. Deshalb konnte hier das N-terminale Fragment von ca. 38 kD nur mit dem ungeschnittenen Protein wieder aufgereinigt werden (Abb. 21, Spuren 5 und 6).

DcuS X_a3 wurde darauf getestet, ob der Proteaseverdau auch in rekonstituiertem Protein durchgeführt werden kann. Rekonstituiertes DcuS X_a3 konnte jedoch, im Gegensatz zur löslichen Probe nicht mehr vollständig durch die Protease geschnitten werden (Abb. 20, Spur 9). Dies könnte auf die Orientierung der Proteine in der Membran nach der Rekonstitution, oder eine veränderte Konformation nach Rekonstitution zurückzuführen sein. Sowohl die Orientierung als auch die Konformationsänderung könnten den Zutritt der Protease zur Spaltstelle verhindern. Der Ansatz, durch Proteaseverdau verkürztes DcuS für die Festkörper NMR zu gewinnen, wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

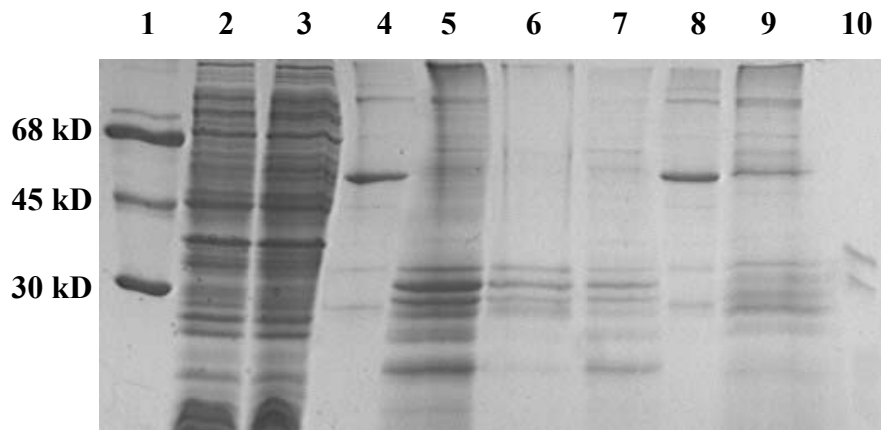


Abb. 20: Überexpression, Reinigung und Faktor X_a Verdau von DcuS X_{a3} . Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Spur:

1: Proteinstandard	
2: Zellhomogenat vor der Induktion	20 μ g Protein
3: Zellhomogenat nach 3 h Induktion	20 μ g Protein
4: Elution der Ni-NTA-Säule, Fraktion 2	4 μ g Protein
5: gereinigtes Protein nach Faktor X_a Verdau	10 μ g Protein
6: Elution der Ni-NTA-Säule nach Faktor X_a Verdau	2 μ g Protein
7: Durchlauf der Ni-NTA-Säule	2 μ g Protein
8: rekonstituiertes DcuS X_{a3}	4 μ g Protein
9: rekonstituiertes DcuS X_{a3} nach Faktor X_a Verdau	4 μ g Protein
10: Faktor X_a Protease	1 μ g Protein

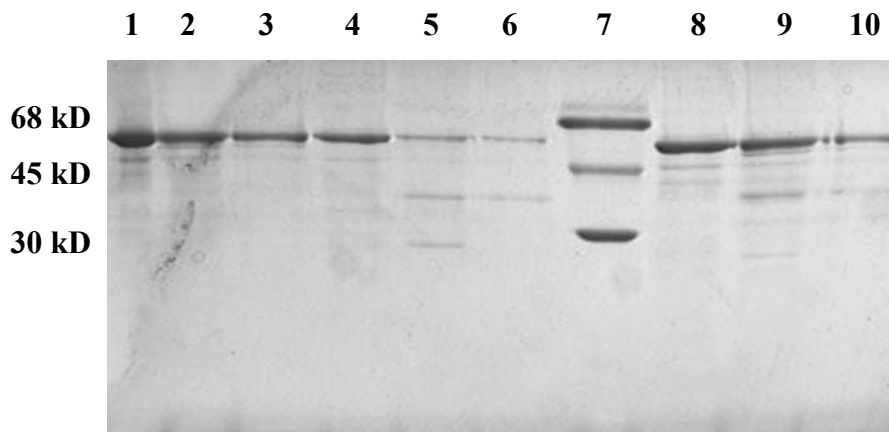


Abb. 21: Reinigung und Faktor X_a Verdau von DcuS X_{a4} , DcuS X_{a5} und DcuS X_{a6} . Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Spur:

1: gereinigtes DcuS X_{a4}	5 μ g Protein
2: DcuS X_{a4} nach Faktor X_a Verdau	5 μ g Protein
3: gereinigtes DcuS X_{a4} nach Faktor X_a Verdau	4 μ g Protein
4: gereinigtes DcuS X_{a5}	4 μ g Protein
5: DcuS X_{a5} nach Faktor X_a Verdau	2 μ g Protein
6: gereinigtes DcuS X_{a5} nach Faktor X_a Verdau	2 μ g Protein
7: Proteinstandard	
8: gereinigtes DcuS X_{a6}	5 μ g Protein
9: DcuS X_{a6} nach Faktor X_a Verdau	5 μ g Protein
10: gereinigtes DcuS X_{a6} nach Faktor X_a Verdau	3 μ g Protein

Konstruktion von C-terminal verkürztem DcuS für die NMR-Spektroskopie

Neben der Herstellung von Proteasemutanten wurde in einer weiteren Strategie versucht, C-terminal verkürztes DcuS direkt in einen Expressionsvektor zu klonieren und zu überproduzieren. Da dieses verkürzte Konstrukt eine möglichst geringe Größe besitzen sollte, sollte die periplasmatische Domäne mit den flankierenden Transmembranhelices und mit einem möglichst kurzen cytoplasmatischen Anteil kloniert werden. Das Plasmid pdcuStm codierte für DcuS₁₋₂₀₆ (Abb. 22 A) mit einem kalkulierten Molekulargewicht von ca. 28 kD. Dieses Konstrukt trägt hinter TM2 nur 28 weitere Aminosäuren, von denen 4 von DcuS, und der Rest aus einem Anhang von 24 AS stammen. Das Protein konnte jedoch nicht überproduziert werden.

Ein weiterer Ansatz war die Klonierung von verkürztem DcuS einschließlich der cytoplasmatischen PAS Domäne. Laut Swiss-Prot Datenbankeintrag für DcuS umfasste diese Domäne den Bereich von AS 220 bis 291. Der 5'-terminale Bereich von *dcuS* der für die Aminosäuren 1 bis 291 codiert wurde in pET28a inkloniert. Das resultierende Plasmid pMW250 codierte für das Protein DcuS₁₋₂₉₁ (Abb. 22 B) mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kD. Nach Induktion der Überexpression im Stamm BL21DE3 zeigte sich in der SDS-PAGE ein leichter Anstieg der Intensität einer Bande bei der erwarteten Größe, was für eine geringe Überproduktion des Proteins sprach. Mittels Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule konnte das Protein nur in sehr geringen Mengen von wenigen hundert µg aufgereinigt werden, die für die Festkörper NMR nicht ausreichend waren.

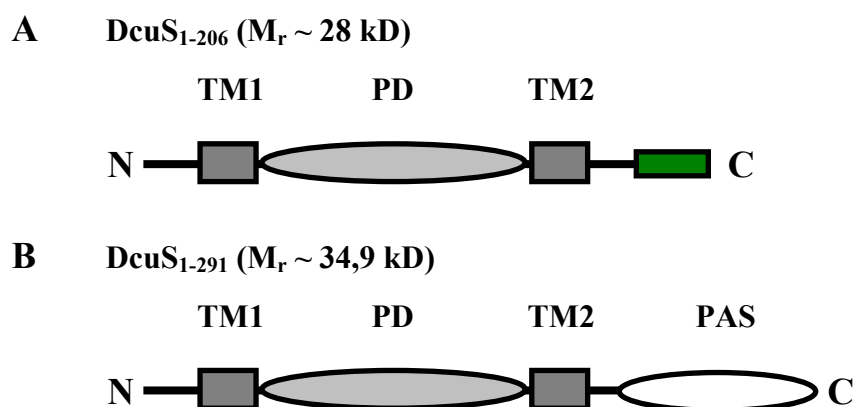


Abb. 22: Vergleich der C-terminal verkürzten Varianten DcuS₁₋₂₀₆ (A) und DcuS₁₋₂₉₁ (B). Die grüne Box in (A) gibt die C-terminale Extension des Konstruktes von 24 AS wieder, die durch die Klonierung in den Vektor entstand.

Der Befund, dass DcuS₁₋₂₉₁, nicht aber DcuS₁₋₂₀₆, überproduziert werden konnte, legte den Schluss nahe, dass die in DcuS₁₋₂₉₁ enthaltene cytoplasmatische PAS-Domäne das Protein stabilisierte und eine Expression ermöglichte. Es bestand die Vermutung, dass die geringe Expression von DcuS₁₋₂₉₁ darauf beruht, dass die Fragmentisierung von DcuS an einer ungünstigen Stelle durchgeführt wurde. Dies könnte darauf beruhen, dass die Domänengrenzen von PAS in der SwissProt Datenbank nicht richtig wiedergegeben sind, oder dass weitere Strukturen die Bildung von stabilen Konstrukten stören. Deshalb sollte für weitere Konstrukte eine günstigere Schnittstelle gesucht werden.

PAS Domänen sind gekennzeichnet durch eine nur sehr schwach ausgeprägte Homologie auf der Ebene der Aminosäuresequenz, weisen jedoch eine hohe Homologie in der Sekundär- und Tertiärstruktur auf (Taylor and Zhulin, 1999). Dies geht aus einem Vergleich der Struktur von PAS Domänen aus unterschiedlichen Proteinen wie FixL (Gong *et al.*, 1998), dem Photoactive Yellow Protein (PYP, Pellequer *et al.*, 1998) und dem Humanen ERG Kaliumkanal (HERG, Morais Cabral *et al.*, 1998) hervor. Aus diesem Grund wurde die Sekundärstruktur der PAS Domäne von DcuS berechnet (Abb. 23). Das Programm PROF (Rost and Sander, 1993; Rost *et al.*, 1996) bestimmt die Sekundärstruktur von Proteinen mit einer Genauigkeit von mehr als 70 %. Die Aminosäuresequenz von Position 210 – 325 aus DcuS, die den Bereich der PAS Domäne umfasst, wurde zur Berechnung verwendet. Die berechnete Sekundärstruktur wurde mit der Sekundärstruktur von PYP aus *Halorhodospira halophila* verglichen, da PYP als Modell für die Struktur von PAS Domänen gilt (Pellequer *et al.*, 1998). Der Vergleich beider Domänen ergab eine hohe Übereinstimmung der Sekundärstrukturen (Abb. 23).

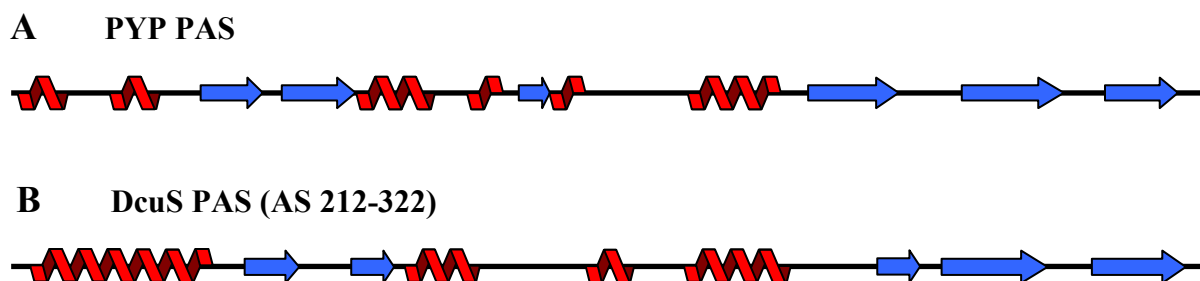


Abb. 23: Sekundärstruktur der PAS Domäne des Photoactive Yellow Protein (PYP) aus *Halorhodospira halophila* (A) und Vergleich mit der berechneten Sekundärstruktur der cytoplasmatischen PAS Domäne aus DcuS (B). α -helicale Bereiche sind als rote Bänder dargestellt, β -Faltblätter als blaue Pfeile.

Auf Grund dieses Vergleichs wurde der Bereich, den die DcuS PAS Domäne umspannt auf die Aminosäuren 212 – 322 ausgedehnt. Klonierung kompletter PAS-Domänen könnte wesentlich zur Stabilisierung weiterer C-terminal verkürzter Konstrukte beitragen.

Nach diesen Informationen über die PAS Domäne von DcuS wurden drei neue Plasmide hergestellt, pMW309, pMW310 und pMW311 (Abb. 24). Diese codieren für verkürzte DcuS Proteine die die periplasmatische Domäne, die Transmembranhelices und die cytoplasmatische PAS Domäne umfassen. Zwei dieser Proteine, DcuS-PD/PAS (pMW309, Abb. 24 A) und DcuS₁₋₃₂₆ (pMW310, Abb. 24 B), trugen einen N-terminalen His-tag und konnten über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt werden. DcuS₄₋₃₂₆GST (pMW311, Abb. 24 C) war ein GST-Fusionsprotein, das über eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgereinigt werden sollte.

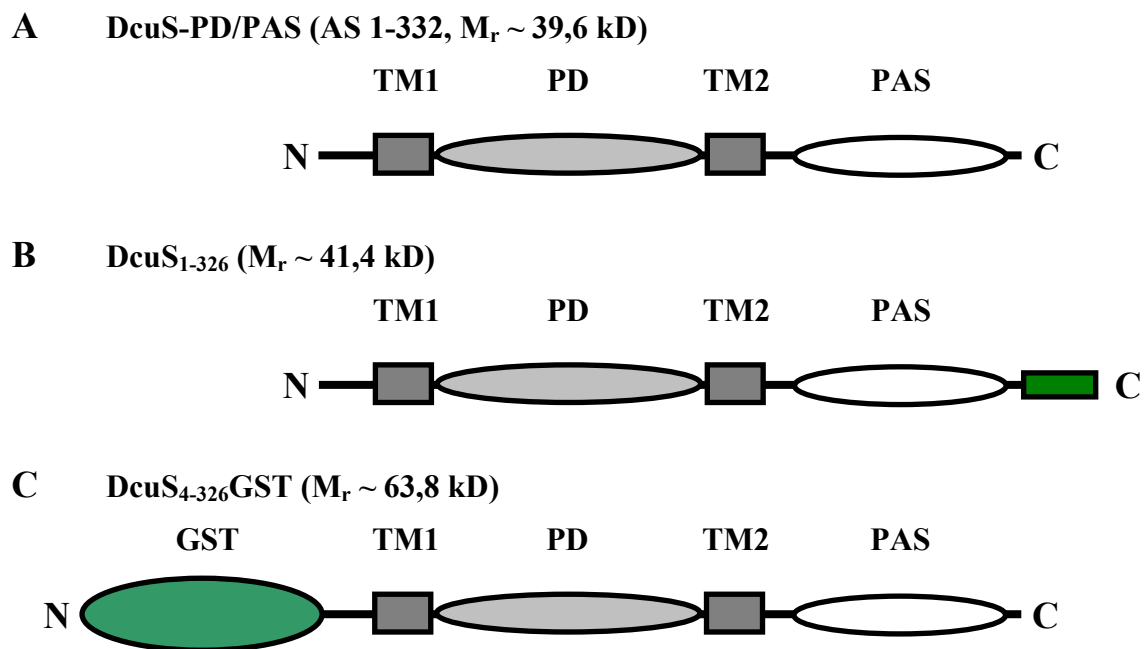


Abb. 24: Vergleichende Übersicht über die Konstrukte zur Überproduktion von C-terminal verkürztem DcuS nach der computergestützten Ermittlung der Grenzen der PAS Domäne. Die Konstrukte DcuS-PD/PAS (A) und DcuS₁₋₃₂₆ (B) enthielten einen N-terminalen His-tag, DcuS₄₋₃₂₆GST (C) eine GST-DcuS Proteinfusion. Die grüne Box in (B) gibt die C-terminale Extension des Konstrukts von 23 AS durch die Klonierung in den Vektor wieder.

Nach Induktion der Überexpression im Stamm C43DE3 erschien bei allen Konstrukten eine zusätzliche oder verstärkte Bande der erwarteten Größe (Abb. 25).

DcuS₄₋₃₂₆GST konnte mittels Affinitätschromatographie nicht aufgereinigt werden. DcuS₁₋₃₂₆ konnte nach Zellaufschluss in großer Menge in der Membranfraktion nachgewiesen werden.

Jedoch konnte nur ein geringer Anteil des Proteins gereinigt werden. Die geringen Mengen waren für eine Verwendung in der NMR-Spektroskopie nicht ausreichend.

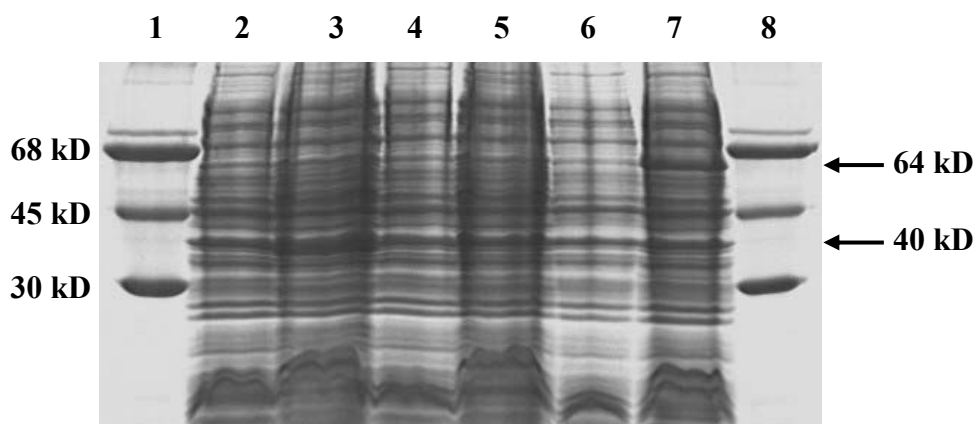


Abb. 25: Überexpression von DcuS-PD/PAS, DcuS₁₋₃₂₆ und DcuS₄₋₃₂₆GST in C43DE3. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Spur:

- | | |
|---|---------------|
| 1: Proteinstandard | |
| 2: DcuS-PD/PAS Zellhomogenat vor der Induktion | 20 µg Protein |
| 3: DcuS-PD/PAS Zellhomogenat nach 3 h Induktion | 25 µg Protein |
| 4: DcuS ₁₋₃₂₆ Zellhomogenat vor der Induktion | 20 µg Protein |
| 5: DcuS ₁₋₃₂₆ Zellhomogenat nach 3 h Induktion | 25 µg Protein |
| 6: DcuS ₁₋₃₂₆ GST Zellhomogenat vor der Induktion | 15 µg Protein |
| 7: DcuS ₁₋₃₂₆ GST Zellhomogenat nach 3 h Induktion | 20 µg Protein |
| 8: Proteinstandard | |

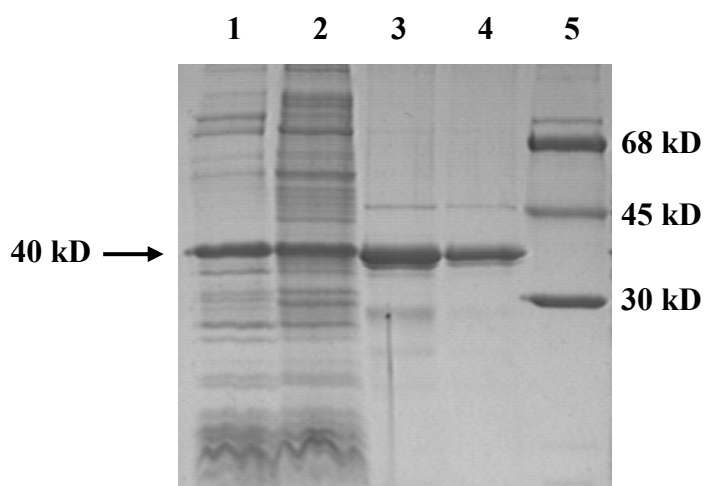


Abb. 26: Überexpression und Reinigung von DcuS-PD/PAS. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Spur:

- | | |
|---|---------------|
| 1: DcuS-PD/PAS Zellhomogenat vor der Induktion | 10 µg Protein |
| 2: DcuS-PD/PAS Zellhomogenat nach 3 h Induktion | 15 µg Protein |
| 3: Elution der Ni-NTA-Säule, Fraktion 2 | 5 µg Protein |
| 4: Elution der Ni-NTA-Säule, Fraktion 3 | 2 µg Protein |
| 5: Proteinstandard | |

DcuS-PD/PAS befand sich nach Überproduktion, wie DcuS₁₋₃₂₆, in großer Menge in der isolierten Membranfraktion. Durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule und Abwaschen von Proteinverunreinigungen wurde das Protein in reiner Form erhalten (Abb. 26). Aus 100 mg Gesamtprotein konnten 1,1 mg DcuS-PD/PAS erhalten werden (Tab. 8), was die Ausbeute von Wildtyp-DcuS um nahezu 50 % überstieg. Diese Variante von DcuS sollte für die Untersuchungen durch Festkörper-NMR eingesetzt werden.

Tab. 8: Ausbeute der Reinigung von DcuS-PD/PAS

	Ausbeute (%)	Protein [mg] ^a
Gesamtprotein	100	1082
Lösliches Protein	59,5	643
Membranprotein	40,5	438
Gereinigtes Protein	1,1	11,6

Für die Untersuchung durch Festkörper-NMR musste das Protein in Membranen rekonstituiert werden. Bei diesem Prozess sollten wegen der erforderlichen großen Proteinmenge keine, oder nur geringe, Verluste an Protein auftreten. Die Rekonstitution von DcuS-PD/PAS wurde deshalb unter verschiedenen Bedingungen optimiert und an diese Form von DcuS angepasst.

Die Rekonstitution wurde mit dem Detergenz Triton X-100 und einem Protein:Lipid Verhältnis von 1:10 (w/w) durchgeführt, da für die Messungen ein hohes Protein/Lipid-Verhältnis nötig war. Für die Destabilisierung der Liposomen wurden effektive Detergenz:Lipid Quotienten (R_{eff}) von 1,3 und 2,5 getestet. Ein R_{eff} von 1,3 entspricht für Triton X-100 Bedingungen, bei denen ca. 60 – 70 % der Lipide als detergenzgesättigte, noch nicht destabilisierte Liposomen vorliegen und der Rest als gemischte Detergenz:Lipid Micellen (Rigaud *et al.*, 1995). Diese Bedingungen erwiesen sich als optimal für die Rekonstitution einer Reihe von Proteinen. Bei einem R_{eff} von 2,5, erfolgt eine vollständige Solubilisierung der Liposomen, und es liegen nur noch gemischte Detergenz:Lipid Micellen vor. Dieses Mischverhältnis wurde zum Vergleich der Effektivität der Rekonstitution getestet. Die so behandelten Proben von DcuS-PD/PAS wurden nach der Rekonstitution in einem Saccharose Dichtegradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt, um die Effizienz der Rekonstitution, bzw. den Einbau des Proteins in die Liposomen, zu bestimmen. Nach Zentrifugation wurde der Gradient fraktioniert und die Fraktionen durch SDS-PAGE

analysiert (Abb. 27 B). Das Protein fand sich unter beiden Rekonstitutionsbedingungen bei einer Saccharosekonzentration von 10 – 20 % wieder. Dieser Bereich zeigte bereits im Gradienten durch eine Trübung die Anwesenheit der Liposomen (Abb. 27 A). Dies spricht für die weitgehende Rekonstitution des Proteins in Liposomen, da sich das Protein in dem Bereich befand, der der Dichte von Proteoliposomen entspricht und eine entsprechende Trübung aufwies.

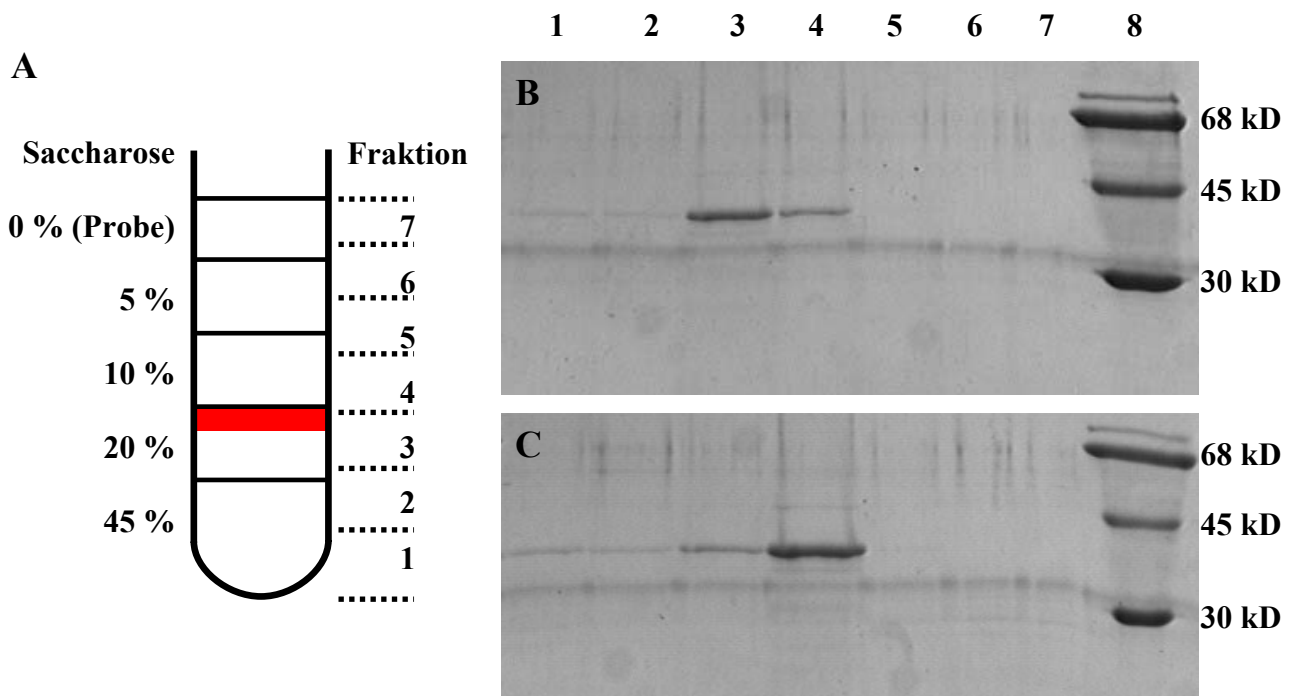


Abb. 27: Kontrolle der Rekonstitution von DcuS-PD/PAS in Saccharose-Dichtegradienten. (A) Aufbau des Saccharose Dichtegradienten. Der Gradient war in Stufen von 45, 20, 10 und 5 % angelegt. Die 5 %ige Saccharoselösung wurde mit der Probe überschichtet. Der Gradient wurde in 7 Fraktionen aufgeteilt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die rote Bande gibt die Lage der Lipidbande im Gradienten wieder, die durch eine Trübung zu beobachten war. (B) und (C) SDS-Page der Rekonstitutionsansätze mit einem R_{eff} von 1,3 (B) und 2,5 (C). Jeweils 20 μl der einzelnen Fraktionen des Gradienten wurden mit Coomassie gefärbt und analysiert. Spuren 1-7: Fraktionen 1-7, Spur 8: Proteinstandard.

Durch die Überproduktion und Reinigung in großen Mengen und die Möglichkeit zur fast verlustfreien Rekonstitution, erfüllte DcuS-PD/PAS die Voraussetzungen für die Verwendung in der Festkörper-NMR-Spektroskopie.

Untersuchung der 3D-Struktur von DcuS-PD/PAS durch NMR-Spektroskopie

Die 3D-Struktur von DcuS-PD/PAS sollte durch Festkörper NMR untersucht werden. Das Prinzip der NMR beruht auf den magnetischen Eigenschaften, die Kerne mit ungepaarten

Protonen oder Neutronen wie ^1H , ^{13}C und ^{15}N in einem äußeren Magnetfeld aufweisen. Der Eigendrehimpuls (Spin) dieser Kerne bewirkt ein magnetisches Moment, das sich parallel oder antiparallel zum Magnetfeld anordnet. Für Kerne mit Spin $\frac{1}{2}$ (z.B. ^1H , ^{13}C , ^{15}N) resultiert diese Anordnung in zwei unterschiedlich besetzten Energieniveaus. Für Spins aus dem niedrigeren Energieniveau lassen sich, durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen, Übergänge auf das höhere Energieniveau induzieren. Die Rückkehr in den Grundzustand (Relaxation) liefert das NMR-Signal.

Die Relaxation ist abhängig von der näheren Umgebung des Spins oder Wechselwirkungen zwischen den Spins. Benachbarte Kerne in der direkten Umgebung führen zu einer lokalen Verstärkung oder Abschwächung des äußeren Magnetfeldes, da sie, abhängig von der Art des Kerns und der Bindung, die Elektronendichte um den Kern verändern. Dieser Effekt wird als chemische Verschiebung bezeichnet. Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Spins führen zu einer Übertragung der Magnetisierung. Die Wechselwirkungen kommen über kovalente Bindungen (skalare Kopplungen) oder über die räumliche Nähe zwischen zwei Spins (dipolare Kopplung) zustande. Dipolare Wechselwirkungen liefern daher Informationen über die Tertiärstruktur des Moleküls.

In 1D-NMR Spektren kommt es für komplexe Moleküle zu einer starken Überlagerung verschiedener Signale. Durch mehrdimensionale Spektroskopie wie der 2D-NMR können die Überlagerungen aufgelöst werden. Bei der 2D-NMR schließt sich einem ersten Puls eine Evolutionsphase an, der ein zweiter Puls, die Mischsequenz, folgt. Während der Mischsequenz erfolgt ein Übertrag der Magnetisierung von einem Kern auf einen anderen. Anschließend wird die Magnetisierung des zweiten Kerns detektiert. Das 2D-Spektrum entsteht aus mehreren Durchläufen, in denen die Evolutionszeit erweitert wird. Das 2D-Spektrum detektiert auf diese Weise miteinander wechselwirkende Kernspins.

Membranproteine in der nativen Umgebung in der Membran, können mit herkömmlicher NMR, wie sie bei löslichen Proteinen angewendet wird, nicht untersucht werden. Durch die Umgebung der Membran können sich die Proteine nicht in alle Richtungen frei bewegen, was in einer anisotropen Probe resultiert. Diese Anisotropie führt zu nicht auswertbaren Spektren. Die Technik der Festkörper-NMR umgeht dieses Problem, indem die Proben unter hohen Geschwindigkeiten von mehreren Kilohertz um einen festen Winkel zum äußeren Magnetfeld rotiert werden (Magic Angle Spinning, MAS).

Festkörper-NMR von DcuS-PD/PAS wurde mit ^{15}N -markiertem und $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markiertem Protein durchgeführt. Die Überproduktion von einfachmarkiertem Protein fand in M9-

Medium mit $^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$ als einziger N-Quelle statt, die Doppelmarkierung in M9-Medium mit $^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$ und ^{13}C -Glucose als einziger C-Quelle (Zientz, 2000). Die markierten Proteine wurden aufgereinigt und konnten nach der Rekonstitution in Liposomen für die NMR-Untersuchungen verwendet werden. Mit diesen Proben wurden mehrere Spektren aufgenommen.

Das 1D-CP-Spektrum (Cross Polarization) zeigt die chemische Verschiebung von rekonstituiertem $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markiertem DcuS-PD/PAS. (Abb. 28). In diesem Experiment wurden die ^{13}C -Kerne angeregt. Die chemische Verschiebung des Proteins ist teilweise überlagert durch die der Lipide. Da ^{13}C ca. 1 % des natürlichen Kohlenstoffs ausmacht, findet er sich auch in dieser Rate in den natürlichen *E. coli* Lipiden wieder, die für die Rekonstitution eingesetzt wurden. Das starke Signal im Spektrum ist hauptsächlich auf die Lipide zurückzuführen und überlagert die Signale von Methylgruppen und C_β -Atomen der Aminosäuren von DcuS-PD/PAS vollständig. Die weiteren Maxima des Spektrums sind dagegen Signale verschiedener Gruppen aus dem Protein.

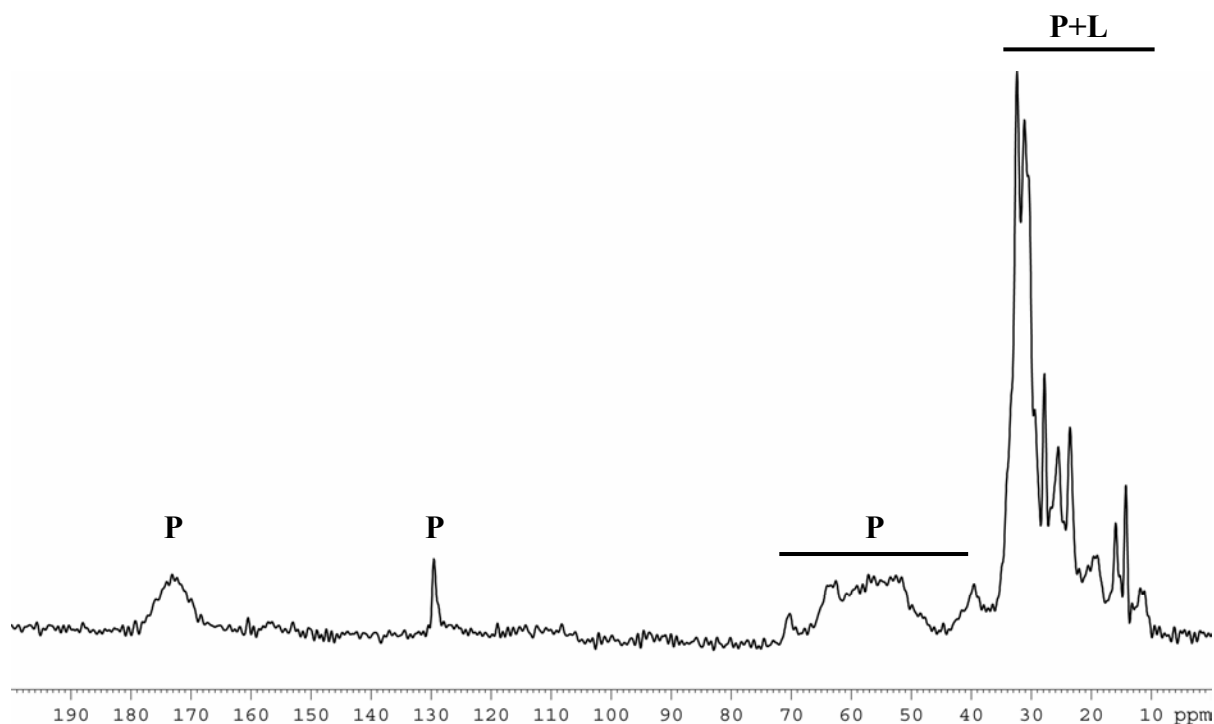


Abb. 28: 1D CP Spektrum von DcuS-PD/PAS. Aufgetragen ist die chemische Verschiebung in ppm des ^{13}C -Signals. P: Proteinsignale, P+L: Proteinsignal überlagert von Lipidsignal.

Im 1D Double Quantum Filter Spektrum der gleichen Probe ist dagegen nur noch die chemische Verschiebung des Proteins zu sehen (Abb. 29). Hier wurde ein 2-Quanten-Zustand der ^{13}C -Kerne angeregt. Ein Signal wird in diesem Spektrum nur erhalten, wenn sich zwei

^{13}C -Kerne in räumlicher Nähe befinden. Da nur 1 % der Lipidkohlenstoffe ^{13}C -Kerne sind, besteht nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit, dass sie unter diesen Bedingungen ein Signal erzeugen. Wegen der fehlenden Lipidsignale wurde deshalb nur noch ein Signal geringerer Intensität im Spektrum beobachtet, das vom Protein herrührte (Abb. 29).

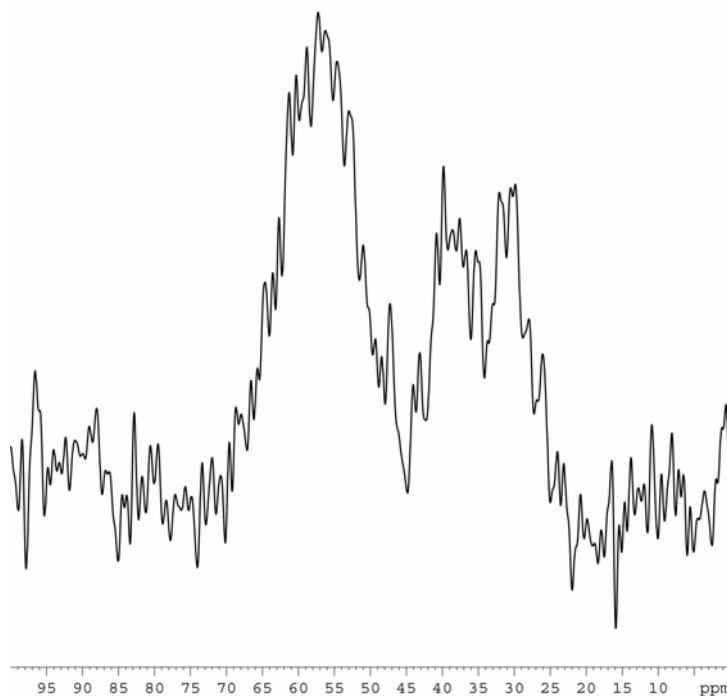


Abb. 29: 1D Double Quantum Filter Spektrum von DcuS-PD/PAS. Dargestellt ist die chemische Verschiebung des ^{13}C -Signals des Proteins. Signale aus den Lipiden wurden in diesem Spektrum nicht registriert.

Mit den 1D Spektren sollte überprüft werden, ob DcuS-PD/PAS für die Festkörper NMR geeignet ist. Strukturinformationen lassen sich aus ihnen noch nicht gewinnen. Dazu wurde mit einer $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markierten Probe ein 2D C,C Spindiffusionspektrum aufgenommen (Abb. 30). In diesem Spektrum wird der Übertrag der Magnetisierung von einem ^{13}C -Kern auf einen zweiten, in räumlicher Nähe befindlichen, ^{13}C -Kern gemessen. Diese Spindiffusion beruht auf einer Wechselwirkung zwischen räumlich benachbarten, aber nicht über kovalente Bindungen direkt verbundenen Kernen. Durch diese Wechselwirkungen resultieren Kreuzpeaks im 2D-Spektrum, die sich nur aus Proteinsignalen zusammensetzen sollten. Sie sind abseits der Diagonalen im Spektrum zu finden. Im Idealfall wären für DcuS-PD/PAS mehrere hundert dieser Kreuzpeaks zu erwarten (Abb. 31), aus denen die 3D-Struktur berechnet werden kann. Da diese erste Probe noch ein schlechtes Signal-zu-Rausch Verhältnis aufwies, konnten nur wenige Signale detektiert werden. Die massiv auftretenden Signale mit hoher Intensität in der

Diagonale des Spektrums sind auf Signale zurückzuführen, die vor und nach der Mischsequenz auf dem gleichen Kern lokalisiert waren. Sie sind dem 1D-Spektrum äquivalent und liefern noch keine Strukturinformationen.

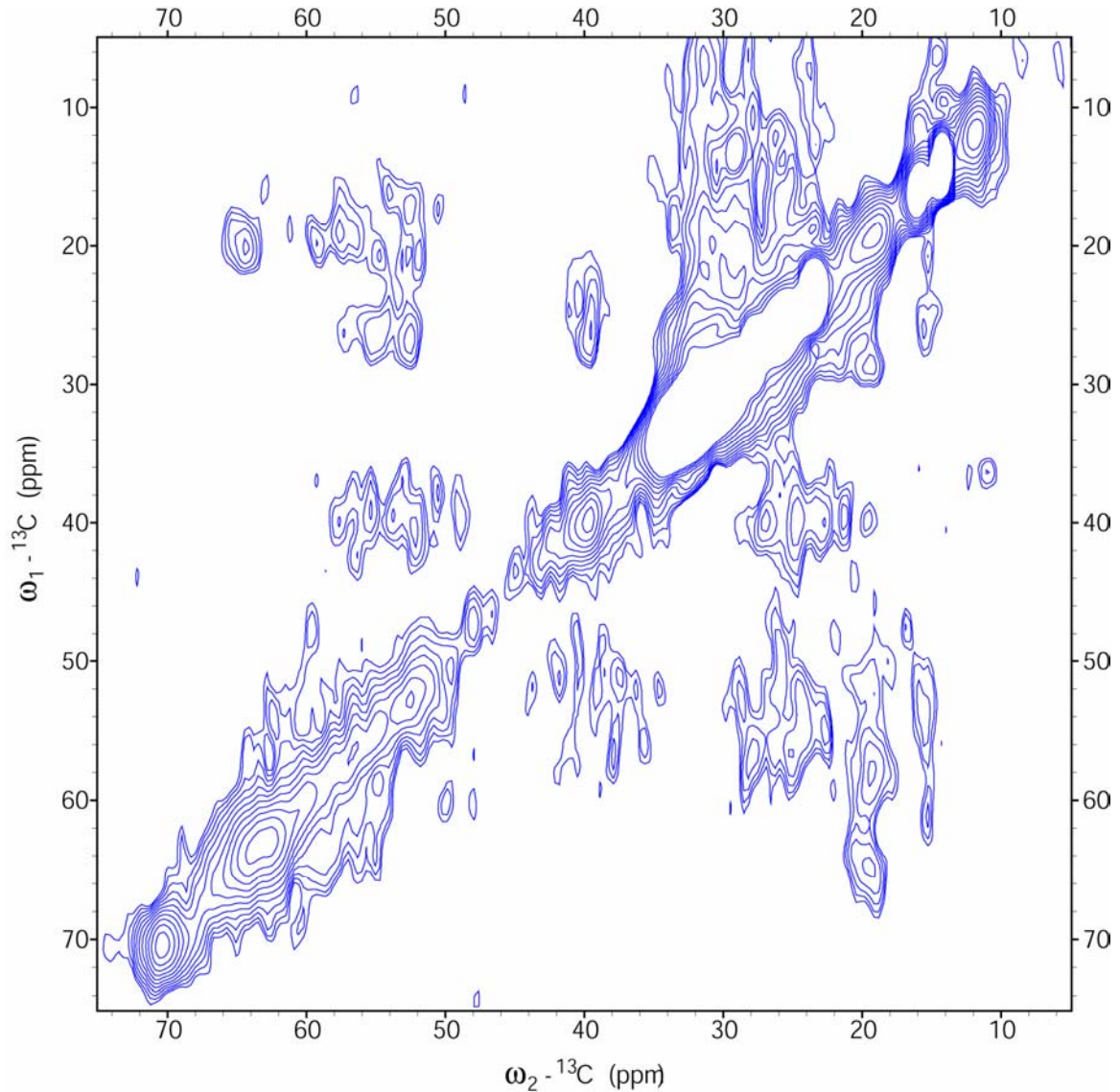


Abb. 30: 2D C,C Spindiffusionsspektrum von DcuS-PD/PAS. In diesem Spektrum wird der Übertrag der Magnetisierung von einem ^{13}C -Kern auf einen räumlich benachbarten ^{13}C -Kern registriert. Die Frequenz des ersten Kerns ist auf der Y-Achse, die des zweiten Kerns auf der X-Achse aufgetragen.

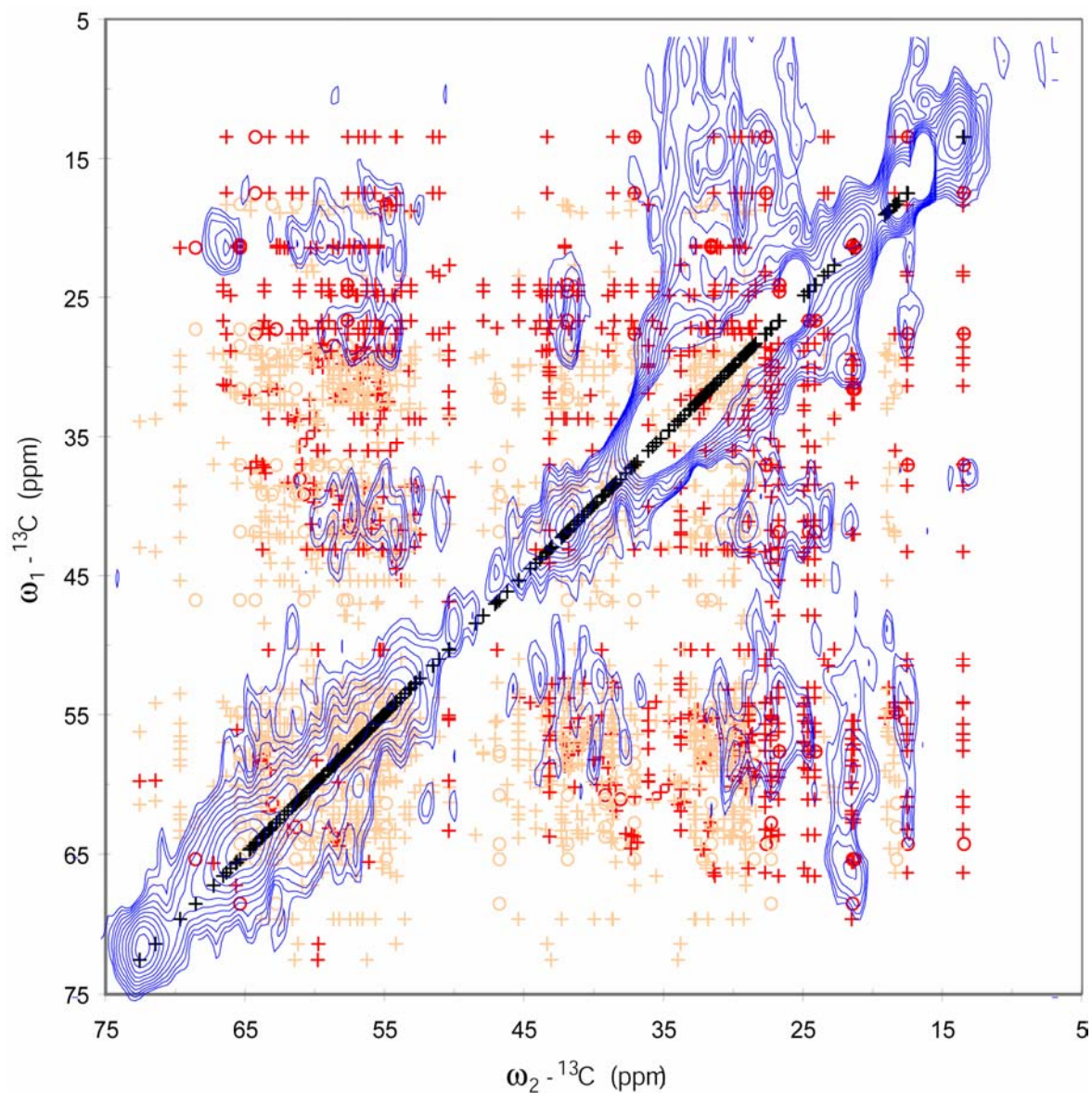


Abb. 31: 2D C,C Spindiffusionsspektrum von DcuS-PD/PAS. Das Spektrum (blau) wurde überlagert mit Signalen, die aus der Sequenz des Proteins berechnet wurden. Für die berechneten Signale wurde eine helicalen Struktur der Transmembranhelices, und eine Coil-Struktur für den Rest des Proteins angenommen. Die Überlagerung gibt einen Überblick über die Qualität des aufgenommenen Spektrums. Rot: intraresiduale Kreuzpeaks, Orange: interresiduale Kreuzpeaks, Schwarz: Signale ohne Übertrag.

5. Diskussion

Substratspezifität der Histidinkinase DcuS

Das Zweikomponentensystem DcuSR reguliert die Expression der Gene der anaeroben Fumaratatmung in Gegenwart externer C₄-Dicarbonsäuren. Die Erkennung der Effektoren erfolgt durch die periplasmatische Domäne der Sensorkinase DcuS. Induzierende Dicarbonsäuren weisen einen Abstand zwischen den C-Atomen der Carboxygruppen zwischen 3,1 Å (Maleinat) und 3,8 Å (gesättigte C₄-Dicarbonsäuren und Fumarat) auf. Liegen die Abstände außerhalb dieses Bereichs wie in der C₃-Dicarbonsäure Malonat (2,5 Å) und der C₅-Dicarbonsäure Glutarat (4,8 Å), findet nur noch eine sehr stark reduzierte Induktion durch den Rezeptor statt. Die Unterschiede zwischen den C₃-/C₅-Dicarbonsäuren und den C₄-Dicarbonsäuren äußern sich auch in der niedrigeren Affinität des Sensors zu den Effektoren. Die Affinität von DcuS zu Malonat nimmt deshalb in ähnlicher Weise ab wie die Induktion.

Die Carboxygruppen der Carbonsäuren können teilweise auch durch Nitrogruppen ersetzt werden. Nitropropionat induziert das System im gleichen Ausmaß wie Fumarat (Bock, 2004). In Nitropropionat liegt der Abstand zwischen dem C-Atom der Carboxygruppe und dem N-Atom der Nitrogruppe wie in den C₄-Dicarbonsäuren bei 3,8 Å. Ersetzt man die Carboxygruppen gegen Sulfongruppen, so befinden sich die Schwefelatome der Sulfongruppen in einem Abstand von 4,2 Å und es findet keine Induktion mehr statt (Bock, 2004). Somit scheint nicht die genaue Art der ionisierten Gruppe die tragende Rolle zu spielen, sondern der Abstand der Gruppen zueinander.

DcuS toleriert weiter eine Reihe von Substitutionen an den Positionen C₂ und C₃ der Substrate. Kleine, polare Substituenten wie Hydroxy- oder Aminogruppen (Tartrat, Aspartat) haben keinen Einfluß auf die maximale Induktion des Systems und die Affinität des Sensors zum Substrat. Voluminöse polare oder apolare Substituenten werden hingegen schwer (Citrat) oder nicht toleriert (Phthalat).

DcuS bildet zusammen mit den Proteinen CitA aus *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Bott *et al.*, 1995), CitS aus *Streptomyces coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996), CitS, YufL und DctS aus *Bacillus subtilis* (Yamamoto *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2000) die CitA-Familie von Sensorproteinen (Kaspar *et al.*, 1999). Diese Sensorkinasen besitzen untereinander ausgeprägte Sequenzhomologien, die sich über die gesamte Länge der Proteine erstreckt. Unterschiede zwischen den Proteinen zeigen sich in ihrer Signalspezifität. Keiner der bereits untersuchten Sensoren dieser Gruppe weist ein ähnlich breites Substratspektrum auf wie

DcuS. Die CitA Proteine aus *E. coli* und *K. pneumoniae* sowie CitS aus *B. subtilis* sind äußerst spezifische Citratsensoren (Kaspar *et al.*, 1999; Kaspar and Bott, 2002; Yamamoto *et al.*, 2000). DctS aus *B. subtilis* erkennt die C₄-Dicarbonsäuren Fumarat und Succinat (Asai *et al.*, 2000), YufL ist ein malatspezifischer Sensor (Tanaka *et al.*, 2003).

Mit den Zweikomponentensystemen DctSR aus *Rhodobacter capsulatus* (Hamblin *et al.*, 1993) und DctBD aus *Rhizobium leguminosarum* (Ronson *et al.*, 1987) sind zwei weitere C₄-dicarbonsäurespezifische Systeme bekannt, die keine signifikanten Homologien zu den Proteinen der CitA-Familie aufweisen (Janausch *et al.*, 2002).

Von den Histidinkinasen CitA aus *K. pneumoniae* und DcuS wurde die Struktur der periplasmatischen Substratbindedomäne aufgeklärt. Dies erlaubt einen direkten Vergleich auf der Strukturebene der beiden Proteine hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Substratspezifität. Die Struktur der periplasmatischen Domäne von CitA wurde durch Röntgenstrukturanalyse in hoher Auflösung in Anwesenheit von Citrat aufgeklärt (Reinelt *et al.*, 2003). In der Struktur konnten alle an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren identifiziert werden (Abb. 32 A). Die Strukturaufklärung der periplasmatischen Domäne von DcuS erfolgte durch NMR-Spektroskopie (Pappalardo *et al.*, 2003) und erlaubte nicht die direkte Bestimmung der Substratbindestelle. An der Substratbindung beteiligte Aminosäuren wurden separat durch gerichtete Mutagenese ermittelt (Janausch, 2001; Kneuper *et al.*, 2005) und konnten in die Struktur überführt werden (Abb. 32 B).

Beide Strukturen weisen eine hohe Übereinstimmung mit der allgemeinen Struktur von PAS-Domänen auf (Taylor and Zhulin, 1999). Sie besitzen eine zentrale β -Faltblattstruktur, die von α -Helices flankiert wird. Die Substratbindestellen von CitA und DcuS befinden sich im zentralen Bereich um das β -Faltblatt. In homologer Position befindet sich bei bekannten Vertretern aus der Familie der PAS-Domänen der reaktive Cofaktor (Borgstahl *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1998).

Die Substratbindung erfolgt in CitA über eine Reihe positiv geladener oder polarer Aminosäuren. Diese interagieren über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carboxygruppen und der Hydroxygruppe des Citrat. Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen den Aminosäuren H112, S144, L145 (COOH-Gruppe 1), T101, R109 (COOH-Gruppe 2) und K152, S169 (COOH-Gruppe 3) sowie R150 und der Hydroxygruppe aus. Alle an der Bindung von Citrat beteiligten Aminosäuren befinden sich in oder in unmittelbarer Nähe der zentralen β -Faltblattstruktur.

In DcuS finden sich Aminosäuren, die diesen Citrat-bindenden Aminosäuren äquivalent sind. Zu R109, H112 und R150 von CitA sind die Aminosäuren R107, H110 und R147 von DcuS

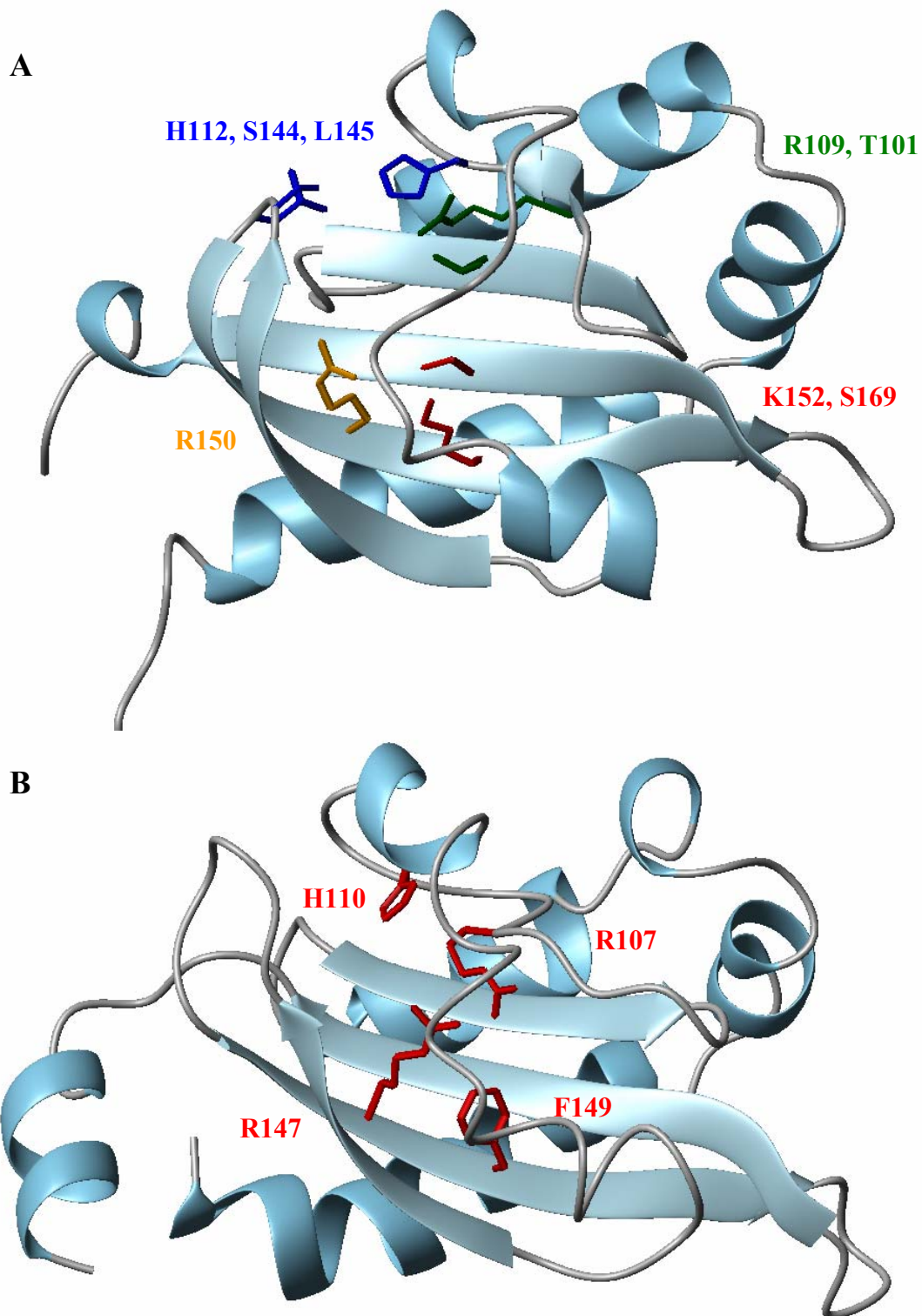


Abb. 32: Vergleich der Strukturen der periplasmatischen Domänen von CitA (A) und DcuS (B). Aminosäuren die an der Bindung des Substrates beteiligt sind, wurden farblich hervorgehoben. (A) Aminosäuren die an der Bindung der COOH-Gruppe 1 (blau), 2 (grün) und 3 (rot), sowie an der Bindung der Hydroxygruppe (orange) des Citrat beteiligt sind wurden farbcodiert in Gruppen zusammengefasst. (B) An der Fumaratbindung in DcuS beteiligte Aminosäuren sind rot dargestellt.

homolog. Sowohl die Aminosäuren als auch ihre Positionen in der Struktur der Domänen sind konserviert. Es ist daher anzunehmen, dass diese Reste in DcuS ebenfalls über Wasserstoffbrücken mit den Carboxygruppen von Fumarat wechselwirken wie die homologen Reste in CitA. Die genaue Bindung des Effektormoleküls in DcuS über diese Reste sollte sich, aufgrund der Unterschiede in der Struktur der Effektoren, jedoch unterscheiden. CitA K152 ist dagegen in DcuS ausgetauscht gegen Phenylalanin (F149), die Position ist allerdings konserviert. Ob F149 in ähnliche Wechselwirkungen mit dem Substrat tritt wie K152 in CitA oder eine andere Bedeutung besitzt, ist unklar. Eine Mutation in F149, wie auch ein Austausch gegen Lysin, resultiert in inaktivem DcuS.

Im Gegensatz zu CitA befinden sich nicht alle an der Substratbindung in DcuS beteiligten Reste im zentralen β -Faltblatt. Die β -Faltblattstruktur in DcuS besteht aus einem viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt, während sie in CitA aus 5 antiparallelen Strängen besteht (Abb. 32). Die Aminosäuren R107 und H110 befinden sich in DcuS somit in einem unstrukturierten Bereich außerhalb des β -Faltblattes. Diese Anordnung könnte für die beiden Aminosäuren in einer erhöhten Flexibilität resultieren, vermittelt durch die Beweglichkeit der unstrukturierten Region. Größere Beweglichkeit der an der Substratbindung beteiligten Reste und damit auch eine flexiblere Bindetasche würden die Toleranz von DcuS für die unterschiedlichen Abstände der Carboxylgruppen von 3,1 bis 3,8 Å der Substrate erklären.

Oligomerisierung von DcuS in der Membran

Das Membranprotein DcuS kann isoliert und wieder im aktiven Zustand in Liposomen rekonstituiert werden (Janausch *et al.*, 2002). Um eine gezielte Markierung von DcuS mit Nitroxid-Spinlabeln für EPR-Untersuchungen zu ermöglichen, wurden Cysteinmutanten von DcuS hergestellt, in denen vorhandene Cysteinreste entfernt, und an bestimmten Stellen wieder Cysteinreste eingefügt wurden. Beide Arten von Cysteinmutanten behielten die *in vivo*-Aktivität von DcuS weitgehend bei.

Die EPR-Messungen an der Cysteinmutante DcuS S80C* zeigten, dass das in Liposomen rekonstituierte Protein in einem anderen Zustand als das solubilisierete Protein vorliegt. Die Abstandstransformationen aus den PELDOR-Spektren ergaben für die Detergenz-gelöste Probe eine breite Abstandsverteilung der Nitroxidmarkierungen zueinander. Kein Abstand trat bevorzugt auf, was bei einer Dimerisierung bzw. Oligomerisierung zu erwarten wäre. Die Abstandstransformation für die rekonstituierten Proben ergab dagegen diskrete Abstände der Proteine in den Liposomen. Es wurden ein dominierender Abstand bei ca. 41 Å und ein

weiterer bei ca. 25 Å beobachtet. Diese diskreten Abstände der Nitroxide zueinander deuten auf eine Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von DcuS in der Membran hin.

Es ist noch nicht bekannt, wie die Bindung des Effektors Fumarat (oder anderer C₄-Dicarbonsäuren) DcuS in die aktive Form überführt. Ähnliches gilt für alle anderen membranständigen Histidinproteinkinasen. Es sind verschiedene Möglichkeiten denkbar, wie die Effektorbindung DcuS aktiviert. Eine Möglichkeit, dass Fumarat oder andere induzierend wirkende C₄-Dicarbonsäuren die Aktivität von DcuS über die Bildung von Dimeren bzw. Oligomeren kontrollieren. Nach diesem Modell würde DcuS ohne Effektor als Monomer in der Membran vorliegen, und Fumarat würde die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung auslösen. Alternativ ist es denkbar, dass DcuS in der Membran generell als Dimer oder Oligomer vorliegt und der Effektor über die Bindung an den Sensor dessen Kinaseaktivität beeinflusst. So könnte durch Bindung des Effektors die Autokinaseaktivität von DcuS angeschaltet werden, oder ein Gleichgewicht zwischen Autokinase- und Autophosphataseaktivität in Richtung der Kinaseaktivität verschoben werden.

Zwischen den rekonstituierten Proben von DcuS mit oder ohne Fumarat wurde kein Abstandsunterschied der Nitroxide zueinander festgestellt. Dies ist ein deutliches Zeichen dafür, dass DcuS *in vitro* in der Membran bereits ohne den Effektor in einem dimeren oder oligomeren Zustand vorliegt. Der Effektor würde damit durch die Bindung einen Einfluss auf die Kinaseaktivität, aber nicht auf den Oligomerisierungszustand ausüben.

Eine konstitutive Grundaktivität der Autokinase des isolierten und rekonstituierten Sensors konnte an der Wildtypform von DcuS durch Phosphorylierungsmessungen *in vitro* beobachtet werden (Janausch, 2001; Janausch *et al.*, 2002). Nach Rekonstitution in Liposomen kam es auch ohne Zugabe von Fumarat zu einer Autophosphorylierung von DcuS. Die Anwesenheit von Fumarat verursachte lediglich eine Steigerung der Kinaseaktivität um den Faktor 2 bis 5. Die Ergebnisse aus den EPR-Messungen und den Phosphorylierungsexperimenten lassen darauf schließen, dass rekonstituiertes DcuS *in vitro* als bereits aktives Dimer oder Oligomer vorliegt. Bindung des Effektors würde nur eine Veränderung der Kinaseaktivität auslösen.

In vivo kann die Aktivität von DcuS bisher nur indirekt anhand der Expression des Reportergens (*dcuB*'-'*lacZ*) gemessen werden. Hierbei werden nur sehr geringe Grundaktivitäten im nichtaktivierten Zustand gemessen, entsprechend nimmt die Stimulierung bei Induktion um den Faktor 7-10 zu. Der Unterschied zwischen der *in vivo*-Situation und der Stimulierbarkeit der Kinaseaktivität von DcuS in Liposomen könnte darauf beruhen, dass isoliertem DcuS in Liposomen eine Komponente fehlt, die die Aktivität des Sensors in der nativen Umgebung der Bakterienmembran unterdrückt. Ein solcher

zusätzlicher Faktor könnte der Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB sein (Kleefeld, 2002). Deletion von *dcuB* resultierte in einer Aktivierung von DcuS bereits in Abwesenheit von Fumarat. Diese konstitutive Aktivität von DcuS konnte selbst durch die Zugabe von Effektoren nicht mehr gesteigert werden. Ob eine direkte Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen DcuS und DcuB besteht, ist noch nicht geklärt. Hinweise für Interaktionen zwischen Sensorkinase und reguliertem Transporter gibt es auch für die DctB Sensorkinase und den DctA Transporter aus *Rhizobium leguminosarum* (Reid and Poole, 1998).

Die Kenntnis der Lage der für die Nitroxidmarkierungen verwendeten Serinreste in der periplasmatischen Domäne sollte die Erstellung eines Modells von DcuS in der Membran ermöglichen, das die Orientierung der beiden Monomere zueinander festlegt. Detaillierte Dimerisierungsmodelle konnten für die strukturell homologen Chemotaxissensoren Tar und Tsr aus *E.coli* aufgestellt werden (Bass and Falke, 1999; Kim *et al.*, 1999). Die Chemotaxissensoren gehören jedoch zu einer anderen Klasse von Chemosensoren, den methylakzeptierenden Chemotaxisproteinen (MCP), die keine Sequenzähnlichkeiten zu den Zweikomponentensensoren aufweisen. Die Chemotaxissensoren unterliegen einer Methylierung als einziger chemischer Modifikation (Le Moual *et al.*, 1997). Die Dimerisierung erfolgt bei beiden Proteinen über die Transmembranhelices, die sich weit in die cytoplasmatische und periplasmatische Domäne hinein fortsetzen.

Der Zweikomponentensensor EnvZ liegt *in vivo* ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit als Dimer vor (Yang and Inouye, 1991; Yaku and Mizuno, 1997). EnvZ ist der Sensor der Osmolarität und kontrolliert die Expression der *ompF* und *ompC* Gene, die für Porine der äußeren Membran codieren. EnvZ ist wie DcuS aus zwei Transmembranhelices, einer periplasmatischen Domäne und einer cytoplasmatischen Kinasedomäne aufgebaut. Für die Dimerisierung sind mehrere Proteinbereiche von EnvZ verantwortlich, darunter die periplasmatische Domäne von EnvZ. In dem periplasmatischen Bereich, der der Transmembranhelix 1 folgt, befindet sich eine vorhergesagte α -Helix, die über ein Leucinzipper-ähnliches Motif mit der entsprechenden α -Helix des zweiten Monomers zur Dimerisierung beiträgt (Yaku and Mizuno, 1997; Waukau and Forst, 1999; Khorchid *et al.*, 2005). In der cytoplasmatischen Kinasedomäne von EnvZ befindet sich darüber hinaus die sogenannte DHP-Teildomäne (Dimerization and Histidine phosphotransfer) aus zwei α -Helices, für die eine Homodimerisierung zu einem Vier-Helix-Bündel („four helix bundle“) nachgewiesen wurde (Tomomori *et al.*, 1999). Anhaltspunkte für eine Beteiligung homologer

α -helicaler Bereiche der periplasmatischen Domäne an der Dimerisierung wie bei EnvZ fanden sich ebenfalls in der Kristallstruktur von CitA (Reinelt *et al.*, 2003).

Die α -Helices 1 und 6 der periplasmatischen Domäne von DcuS stellen vermutlich die Verlängerung der Transmembranhelices 1 und 2 in die periplasmatische Domäne dar. Geht man für DcuS von einer Dimerisierung durch die Transmembranhelices oder durch die anschließenden Helices in der periplasmatischen Domäne aus, kann man ein vorläufiges Modell eines DcuS Dimers erstellen (Abb. 33). Die Abstände, die sich daraus ergeben, können durch die EPR-Messungen verifiziert werden. Die gemessenen Abstände der Nitroxide in DcuS S80C* von ca. 41 Å stimmen in Näherung mit den aus diesem Modell hervorgehenden Abständen überein. Eine weitere Verifizierung der Nitroxidabstände von DcuS S45C* und DcuS S179C* oder weiterer Cysteinmutanten ist jedoch nötig.

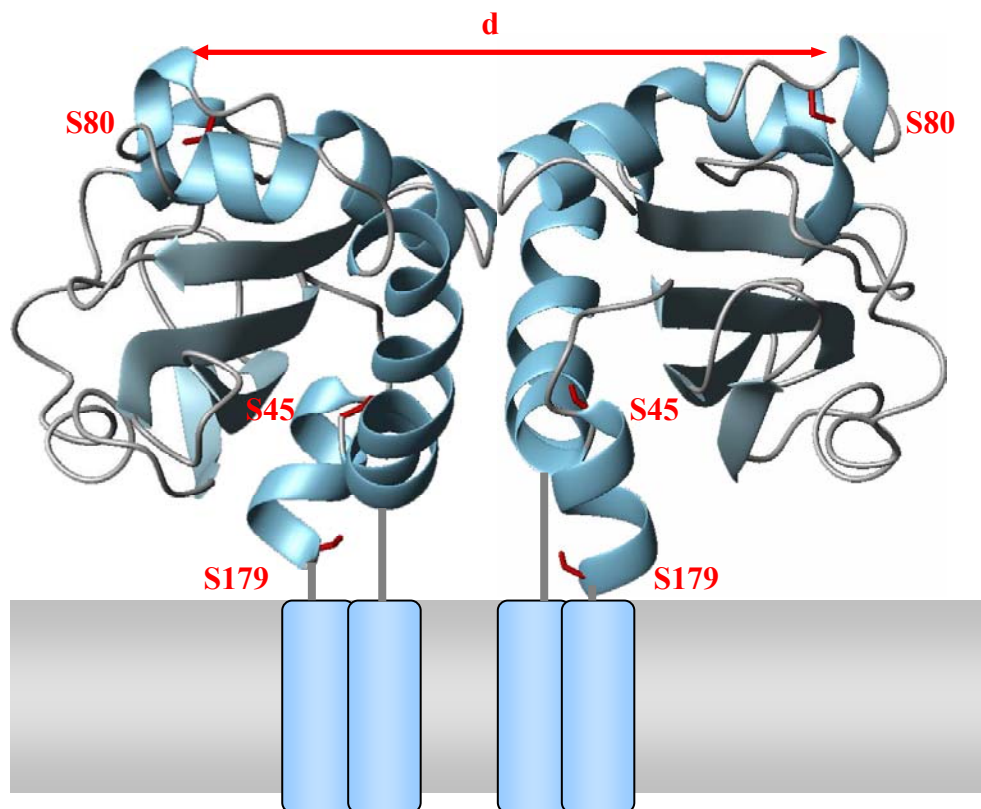


Abb. 33: Abgeleitetes Modell der Dimerisierung der periplasmatischen Domäne von DcuS. Das Modell wurde nach Informationen aus den Sensorproteinen Tar, EnvZ und CitA auf DcuS übertragen. Die Serinreste, die für die Nitroxidmarkierung gegen Cysteinreste ausgetauscht wurden, sind rot hervorgehoben. Der Abstand d zwischen den Serinresten S80 der jeweiligen Monomere entspricht näherungsweise dem in den EPR-Messungen beobachteten dominierenden Abstand von ca. 41 Å.

Struktur und Funktionsweise von DcuS

Strukturuntersuchungen membrangebundener Histidinkinasen sind bisher ausschließlich an isolierten löslichen Domänen durchgeführt worden (Kato *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998; Tomomori *et al.*, 1999; Marina *et al.*, 2001). Nahezu vollständige Strukturuntersuchungen wurden am Aspartatsensor Tar und dem Serinsensor Tsr aus *E. coli* durchgeführt, die zur Familie der methylakzeptierenden Chemotaxissensoren zählen. Aus den Teilstrukturen konnte ein komplettes Strukturmodell dieser MCP-Sensoren abgeleitet werden (Kim *et al.*, 1999; Falke and Kim, 2000).

Modelle für die Signalübertragung über die Membran wurden für den Aspartatsensor Tar abgeleitet (Yeh *et al.*, 1993; Chervitz and Falke, 1996). Das Kolbenhubmodell (Chervitz and Falke, 1996; Ottemann *et al.*, 1999) wird derzeit favorisiert, da es durch experimentelle Daten besser abgestützt ist. Die Grundlage für das Modell lieferte die Strukturaufklärung der periplasmatischen Domäne (Milburn *et al.*, 1991; Bowie *et al.*, 1995). Die Struktur dieser Sensordomäne unterscheidet sich grundlegend von der der periplasmatischen Domäne von DcuS, obwohl DcuS Effektoren (C₄-Dicarbonsäuren, inklusive Aspartat) erkennt, die dem Effektor von Tar ähnlich oder identisch sind. Die periplasmatische Domäne von Tar besteht aus 4 α -Helices ('four-helix-bundle'), wovon die α -Helices 1 und 4 die Verlängerung der Transmembranhelices (TM) 1 und 2 darstellen. Über die Transmembranhelices erfolgt die Dimerisierung des Sensors. Die Substraterkennung findet an der Kontaktfläche der Monomere in den verlängerten Transmembranhelices statt, wobei pro Dimer nur ein Aspartatmolekül gebunden wird (Biemann and Koshland, 1994). Die Bindung löst eine Verschiebung von wenigen Å in Helix 4 (TM 2) gegenüber Helix 1 (TM 1) aus (Scott and Stoddard, 1994; Danielson *et al.*, 1994; Chervitz and Falke, 1995, 1996; Chervitz *et al.*, 1995; Ottemann *et al.*, 1998).

Die Struktur der periplasmatischen Domäne von DcuS weist am N- und C-Terminus ebenfalls α -Helices auf, von denen vermutet wird, dass sie Verlängerungen der Transmembranhelices 1 und 2 in die periplasmatische Domäne darstellen. Solche erweiterten Helices bilden die Grundlage des Kolbenhubmodells der Signalübertragung über die Membran bei den Chemotaxissensoren. Die Strukturaufklärung an DcuS in der Membran verfolgt das Ziel, den Mechanismus der Signalübertragung von der periplasmatischen Substratbindedomäne zur cytoplasmatischen Domäne aufzuklären. Trotz der großen Unterschiede in der Struktur der Domänen zwischen Tar und DcuS scheint eine Signalweiterleitung auf ähnlichem Weg möglich (Abb. 34). Die bisherigen Untersuchungen können natürlich einen Signaltransfer durch Verdrehen der Transmembranhelices gegeneinander (Torsionsmodell, Chi *et al.*, 1997),

oder ein Verschieben der Stellwinkel der Helices zueinander (Scherenmodell, Kim *et al.*, 1993; Kim, 1994) nicht ausschließen.

Nach der Struktur der periplasmatischen Domäne sollte in Zukunft die Struktur von DcuS in der Membran geklärt werden. In der nativen Umgebung in der Membran sollten sich die exakte Struktur der Transmembranbereiche des Proteins aufklären und Konformationsänderungen nach Bindung von Fumarat beobachten lassen. Diese Strukturuntersuchungen sollen mittels Festkörper-NMR an C-terminal verkürztem DcuS-PD/PAS-Protein durchgeführt werden. Die Qualität der 2D-Spektren ist noch nicht ausreichend, um Strukturinformationen zu erhalten. 2D-Spektren mit verbesserter Qualität wären wichtig, um fumaratinduzierte Konformationsänderungen abzubilden und ein Modell des Signaltransfers über die Membran aufzustellen. Die ersten Untersuchungen mit rekonstituiertem DcuS, die zu dieser Fragestellung durchgeführt wurden, zeigen, dass diese neue Methode anwendbar ist und in Zukunft wichtige Beiträge zur Klärung der Struktur von Membranproteinen in der Membran liefern könnte.

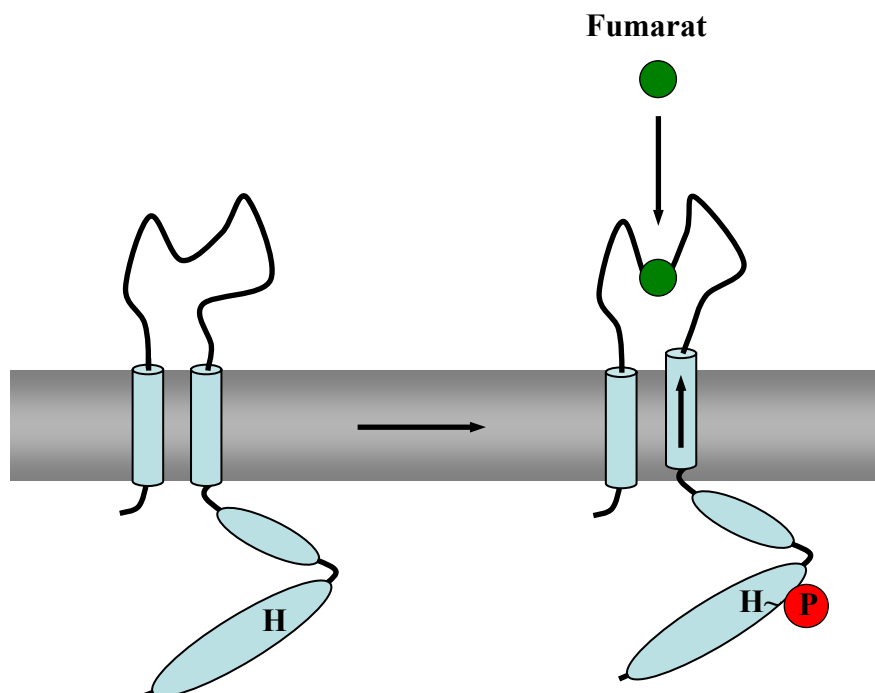


Abb. 34: Modell der Signalübertragung über die Membran in einem DcuS-Monomer. Die Effektorbindung bewirkt eine Konformationsänderung in der periplasmatischen Domäne, die über die Transmembranhelices auf die Kinasedomäne weitergeleitet wird. Dort findet durch die Konformationsänderung eine ATP-abhängige Autophosphorylierung an einem konservierten Histidinrest statt.

6. Veröffentlichungen

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

7. Literatur

- Abo-Amer, A.E., Munn, J., Jackson, K., Aktas, M., Golby, P., Kelly, D.J. and Andrews, S.C. (2005)
DNA interaction and phosphotransfer of the C₄-dicarboxylate-responsive DcuS-DcuR two-component regulatory system from *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 186: 1879-1889
- Armen, R.S., Uitto, O.D. and Feller, S.E. (1998)
Phospholipid component volumes: determination and application to bilayer structure calculations
Biophys. J. 75: 734-744
- 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: 263-271
- Bass, R.B. and Falke, J.J. (1999)
The aspartate receptor cytoplasmic domain: *in situ* chemical analysis of structure, mechanism and dynamics
Structure 7: 829-840
- Biemann, H.P. and Koshland, D.E. Jr. (1994)
Aspartate receptors of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* bind ligand with negative and half-of-the-sites cooperativity
Biochemistry 33: 629-634
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R. and Simon, M.I. (1999)
Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase
Cell 6: 131-141
- Bock, V. (2004)
Substratspezifität und Signaltransduktion des Sensors DcuS von *Escherichia coli*
Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Bott, M., Meyer, M. and Dimroth, P. (1995)
Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*
Mol. Microbiol. 18(3): 533-546
- Borgstahl, G.E.O., Williams, R.D. and Getzoff, E.D. (1995)
1,4 Å structure of photoactive yellow protein, a cytosolic photoreceptor: unusual fold, active site and chromophore
Biochemistry 34: 6278-6287
- Bowie, J.U., Pakula, A.A. and Simon, M.I. (1995)
The three-dimensional structure of the aspartate receptor from *Escherichia coli*
Acta Crystallogr. 51: 145 - 154

- Burbulys, D., Trach, K.A. and Hoch, J.A. (1991)
Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay
Cell 64: 545-552
- Cai, S.-J., Khorchid, A., Ikura, M. and Inouye, M. (2003)
Probing catalytically essential domain orientation in histidine kinase EnvZ by targeted disulfide crosslinking
J. Mol. Biol. 328: 409-418
- Chen, W.P. and Kuo, T.T. (1993)
A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA
Nucleic Acids Res. 21:2260
- Chervitz, S.A., Lin, C.M. and Falke, J.J. (1995)
Transmembrane signaling by the aspartate receptor: engineered disulfides reveal static regions of the subunit interface
Biochemistry 34: 9722-9733
- Chervitz, S.A. and Falke, J.J. (1995)
Lock on/off disulfides identify the transmembrane signaling helix of the aspartate receptor
J. Biol. Chem. 270: 24043-24053
- Chervitz, S.A. and Falke, J.J. (1996)
Molecular mechanism of transmembrane signaling by the aspartate receptor: a model
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2545-2550
- Chi, Y.I., Yokota, H. and Kim, S.H. (1997)
Apo structure of the ligand-binding domain of aspartate receptor from *Escherichia coli* and its comparisons with ligand-bound or pseudoligand-bound structures
FEBS Letters 414: 327-332
- Danielson, M.A., Biemann, H.P., Koshland, D.E. Jr. and Falke, J.J. (1994)
Attractant- and disulfide-induced conformational changes in the ligand binding domain of the chemotaxis aspartate receptor: a ¹⁹F NMR study
Biochemistry 33: 6100-6109
- 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 anaerobic C₄-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 181(18): 5624-5635
- de Groot, H.J.M. (2000)
Solid-state NMR spectroscopy applied to membrane proteins
Curr. Op. Struct. Biol. 10: 593-600
- Dutta, R., Qin, L. and Inouye, M. (1999)
Histidine kinases: diversity of domain organization
Mol. Microbiol. 34: 633-640

- Ellman, G.L. (1959)
Tissue sulfhydryl groups
Acta Biochem. Biophys. 82: 70-77
- Engel, P., Krämer, R. and Unden, G. (1992)
Anaerobic fumarate transport in *Escherichia coli* by an *fnr*-dependent dicarboxylate uptake system which is different from the aerobic dicarboxylate uptake system
J. Bacteriol. 174: 5533-5539
- Falke, J.J. and Kim, S.-H. (2000)
Structure of a conserved receptor domain that regulates kinase activity: the cytoplasmic domain of bacterial taxis receptors
Curr. Opin. Struct. Biol. 10: 462-469
- 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
- Gong, W., Hao, B., Mansy, S.S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.A. and Chan, M.K. (1998)
Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 15189-15193
- 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
- Heermann, R., Altendorf, K. and Jung, K. (1998)
The turgor sensor KdpD of *Escherichia coli* is a homodimer
Biochim. Biophys. Acta 1415: 114-124
- Hidaka, Y., Park, H. and Inouye, M. (1997)
Demonstration of dimer formation of the cytoplasmic domain of a transmembrane osmosensor protein, EnvZ, of *Escherichia coli* using Ni-histidine tag affinity chromatography
FEBS Letters 400: 238-242
- Hoch, J.A. and Silhavy, T.J. (eds) (1995)
Two-component signal transduction
Am. Soc. Microbiol. Press, Washington, D.C.
- Holloway, P.W. (1973)
A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples
Anal. Biochem. 53: 304-308

- Hughson, A.G. and Hazelbauer G.L. (1996)
Detecting the conformational change of transmembrane signaling in a bacterial chemoreceptor by measuring effects on disulfide-crosslinking *in vivo*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11546-11551
- Iuchi, S. and Lin, E.C.C. (1988)
ArcA (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1888-1892
- Iuchi, S., Cameron, D.C. and Lin, E.C.C. (1989)
A second global regulatory gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 171: 868-873
- Janausch, I.G. (2001)
Rekonstitution des Fumaratsensors DcuS in Liposomen und Transport von Fumarat und Succinat in *Escherichia coli*
Dissertation, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Janausch, I.G., Garcia-Moreno, I. and Uden, G. (2002)
Function of DcuS from *Escherichia coli* as a fumarate-stimulated histidine protein kinase *in vitro*
J. Biol. Chem. 277: 39809-39814
- Kaspar, S., Perozzo, R., Reinelt, S., Meyer, M., Pfister, K., Scapozza, L. and Bott, M. (1999)
The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor
Mol. Microbiol. 33 (4): 858-872
- 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
- Kato, M., Mizuno, T., Shimizu, T. and Hakoshima, T. (1997)
Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPT domain of ArcB
Cell 88: 717-723
- Khorchid, A., Inouye, M. and Ikura, M. (2005)
Structural characterization of *Escherichia coli* sensor histidine kinase EnvZ: the periplasmic C-terminal core domain is critical for homodimerization
Biochem. J. 385: 255-264
- Kim, S.-H., Privé, G.G., Yeh, J., Scott, W.G. and Milburn, M.V. (1993)
A model for transmembrane signalling mechanism is a bacterial chemotaxis receptor
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 57: 17-24

- Kim, S.-H. (1994)
“Frozen” dynamic dimer model for transmembrane signaling in bacterial chemotaxis receptors
Protein Sci. 3: 159-165
- Kim, K.K., Yokota, H. and Kim, S.-H. (1999)
Four-helix-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor
Nature 400: 787–792
- Kleefeld, A. (2002)
Der Einfluss der C₄-Dicarboxylatcarrier DcuB und DctA auf die DcuSR-abhängige Genregulation in *Escherichia coli*
Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Kneuper, H., Janausch, I.G., Vijayan, V., Zweckstetter M., Bock, V., Griesinger, C. and Unden, G. (2005)
The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of *Escherichia coli*
J. Biol. Chem. 280: 20596-20603
- Le Moual, H., Quang, T. and Koshland, D.E. (1997)
Methylation of the *Escherichia coli* chemotaxis receptors: intra- and interdimer mechanisms
Biochemistry 36 (43): 13441-13448
- Marina, A., Mott, C., Auyzenberg, A., Hendrickson, W.A. and Waldburger, C.D. (2001)
Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain
J. Biol. Chem. 276: 41182-41190
- Milburn, M.V., Prive, G.G., Milligan, D.L., Scott, W.G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshland, D.E. Jr. and Kim, S.H. (1991)
Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand
Science 254: 1342-1347
- Miller, J.H. (1991)
A short course in bacterial genetics
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Miroux B. and Walker, J.E. (1996)
Guidelines for users of *Escherichia coli* C 41 (DE3) and C 43 (DE3) over-expression host strains
J. Mol. Biol. 260: 289-298
- Mizuno, T. (1997)
Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*
DNA Res. 4: 161-168

- Morais Cabral, J.H., Lee, A., Cohen, S.L., Chait, B.T., Li M. and Mackinnon, R. (1998)
Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus :
a eukaryotic PAS domain
Cell 95: 649-655
- Ninfa, E.G., Atkinson, M.R., Kamberov, E.S. and Ninfa, A.J. (1993)
Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* Nitrogen Regulator II (NRII or
NtrB): *trans*-phosphorylation between subunits
J. Bacteriol. 175: 7024-7032
- Ottemann, K.M., Thorgeirsson, T.E., Kolodziej, A.F., Shin, Y.K. & Koshland, D.E. (1998)
Direct measurement of small ligand-induced conformational changes in the aspartate
chemoreceptor using EPR
Biochemistry 37 (20): 7062-7069
- Ottemann, K.M., Xiao, W., Shin, Y.K. & Koshland, D.E. (1999)
A Piston Model for Transmembrane Signaling of the Aspartate Receptor
Science 285: 1751-1745
- Pappalardo, L., Janausch, I.G., Vijayan, V., Zientz, E., Junker, J., Peti, W., Zweckstetter, M.,
Uden, G. and Griesinger, C. (2003)
The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component
fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*
J. Biol. Chem. 278: 39585-39588
- Parkinson, J.S. and Kofoid, E.C. (1992)
Communication modules in bacterial signaling proteins
Annu. Rev. Genet. 26: 71-112
- 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
- Pellequer, J. L., Wager-Smith, K.A., Kay, S.A. and Getzoff, E.D. (1998)
Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the
PAS domain superfamily
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5884-5890
- Qin, L., Dutta, R., Kurokawa, H., Ikura, M. and Inouye, M. (2000)
A monomeric histidine kinase derived from EnvZ, an *Escherichia coli* osmosensor
Mol. Microbiol. 36: 24-32
- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. and
Hopwood, D.A. (1996)
A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb
Streptomyces coelicolor A3(2) chromosome
Mol. Microbiol. 21: 77-96

- 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 (10): 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., Astwood, P.M., Nixon, B.T. and Ausubel, F.M. (1987)
Deduced products of C₄-dicarboxylate transport regulatory genes of *Rhizobium leguminosarum* are homologous to nitrogen regulatory gene products
Nucl. Acids Res. 15: 7921-7932
- Rost, B. and Sander, C. (1993)
Prediction of protein secondary structure at better than 70 % accuracy
J. Mol. Biol. 232: 584-599
- Rost, B., Fariselli, P. and Casadio, R. (1996)
Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86 % accuracy
Prot. Science 5: 1704-1718
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989)
Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Scott, W.G. and Stoddard, B.L. (1994)
Transmembrane signalling and the aspartate receptor
Structure 2: 877-887
- Shaulsky, G., Escalante, R. and Loomis, W.F. (1996)
Developmental signal transduction pathways uncovered by genetic suppressors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15260-15265
- Shaw, D.J. and Guest, J.R. (1982)
Nucleotide sequence of the *fnr* gene and primary structure of the Fnr protein of *Escherichia coli*
Nucl. Acids Res. 10: 6119-6230

- Simms, S.A., Keane, M.G. and Stock, J.B. (1985)
Multiple forms of the CheB methylesterase in bacterial chemosensing
J. Biol. Chem. 260: 10161-10168
- Stewart, V. (1993)
Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*
Mol. Microbiol. 9: 425-434
- Stewart, V. and Rabin, R.S. (1995)
Dual sensors and dual response regulators interact to control nitrate and nitrite-responsive gene expression in *Escherichia coli*
In: Two component signal transduction, Hoch JA and Silhavy TJ(eds.), ASM Press, Washington DC, pp233-252
- Stock, A.M., Robinson, V.L. and Goudreau, P.N. (2000)
Two-component signal transduction
Annu. Rev. Biochem. 69: 183-215
- 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
- Tanaka, T., Saha, S.K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M.B., Yamazaki, T., Ono, A.M., Kainosho, M., Inouye, M. and Ikura, M. (1998)
NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ
Nature 396: 88-92
- Taylor, B.L. and Zhulin, I.B. (1999)
PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 479-506
- Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S.K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Kurokawa, H., Qian, H., Inouye, M. and Ikura, M. (1999)
Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ
Nature Struct. Biol. 6: 729-734
- Tseng, C.P. (1997)
Regulation of fumarase (*fumB*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, iron and heme availability: role of the *arcA*, *fur* and *hemeA* gene products
FEMS Microbiology Letters 157: 67-72
- Unden, G. and Bongaerts, J. (1997)
Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors
Biochim. Biophys. Acta 1320: 217-234

- van Doorslaer, S. and Schweiger, A. (2000)
One- and two-dimensional pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy: concepts and applications
Naturwissenschaften 87: 245-255
- Waukau, J. and Forst, S. (1999)
Identification of a conserved N-terminal sequence involved in transmembrane signal transduction in EnvZ
J. Bacteriol. 181: 5534-5538
- Wegener, C., Tebbe, S., Steinhoff, H.-J. and Jung, H. (2000)
Spin labeling analysis of structure and dynamics of the Na⁺/Proline transporter of *Escherichia coli*
Biochemistry 39: 4831-4837
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S. and Eisenbach, M. (1993)
Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8787-8791
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. and Graham, M.W. (1989)
Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants
Nucleic Acids Res. 17: 3469-3478
- Yaku, H. and Mizuno, T. (1997)
The membrane-located osmosensory kinase, EnvZ, that contains a leucine zipper-like motif functions as a dimer in *Escherichia coli*
FEBS Letters 417: 409-413
- 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
- Yang, Y. and Inouye, M. (1991)
Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 11057-11061
- Yeh, J.I., Biemann, H.P., Privé, G.G., Pandit, J., Koshland, D.E. and Kim, S.H. (1996)
High-resolution Structures of the Ligand Binding Domain of the wildtype Bacterial Aspartate Receptor
J. Mol. Biol. 262: 186-201
- Zientz, E., Bongaerts, J. and Unden, G. (1998)
Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR*) two-component regulatory system
J. Bacteriol. 180: 5421-5425