

**Funktion der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter  
DctA und DcuB  
als Co-Sensoren von DcuS  
in *Escherichia coli***

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

**Julian Witan**  
geb. am 17.05.1982 in Mainz

Mainz, April 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhalt

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Genregulation des Energiestoffwechsels in <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Wahrnehmung von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten und Genregulation durch DcuSR</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3 Transport und Metabolismus von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten in <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>5</b>
<b>2.4 Transport und Regulation von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten durch DctA-Homologe</b> .....	<b>7</b>
<b>2.5 Metabolismus und Transport von Acetat in <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>9</b>
<b>2.6 Ziele dieser Arbeit</b> .....	<b>10</b>
<b>3 Material und Methode</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1 Verwendete Stämme und Plasmide von <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>11</b>
<b>3.2 Zucht und Medien</b> .....	<b>28</b>
3.2.1 Zucht von <i>Escherichia coli</i> .....	28
3.2.2 Medien und Puffer .....	30
<b>3.3 Molekulargenetische Methoden</b> .....	<b>38</b>
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	38
3.3.2 Konstruktion von Plasmiden.....	40
3.3.3 Stammkonstruktion durch P1-Transduktion und Eliminierung der Resistenzkassette .....	46
3.3.4 Transkriptionsanalyse .....	47
<b>3.4 Biochemische Methoden</b> .....	<b>48</b>
3.4.1 Das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System .....	48
3.4.2 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität und der alkalischen Phosphataseaktivität.....	49
3.4.3 Expression und Nachweis von DctA durch SDS-Gelelektrophorese und Antikörper .....	50
3.4.4 <i>In vivo</i> Fluoreszenzmikroskopie .....	52
3.4.5 Transportmessungen .....	53
<b>3.5 Bioinformatische Methoden</b> .....	<b>54</b>
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>55</b>
<b>4.1 Topologie von DctA aus <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>55</b>
4.1.1 <i>In silico</i> Topologievorhersage von DctA .....	55
4.1.2 <i>In vivo</i> Topologiebestimmung von DctA mit PhoA- und LacZ-Fusionen.....	57
4.1.3 Vergleichende Analyse zwischen DctA und homologen Proteinen.....	61
4.1.4 3D-Strukturmodell-Vorhersage für DctA .....	66

<b>4.2 Genexpression und Funktion von <i>dctA</i></b> .....	<b>68</b>
4.2.1 DcuB und DctA als anaerobe und aerobe Co-Sensoren von DcuS .....	68
4.2.2 Modell für die Regulation der Zielgene von DcuS durch Protein-Protein-Interaktion mit den Co-Sensoren DcuB und DctA .....	71
<b>4.3 Messung von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System</b> .....	<b>72</b>
<b>4.4 BACTH: Interaktion von DcuS mit DctA</b> .....	<b>74</b>
4.4.1 Interaktion von DcuS-Fusionsproteinen mit DctA-Fusionsproteinen .....	74
4.4.2 Interaktion von DcuS mit verkürzten DctA-Varianten.....	76
4.4.3 Interaktion von DcuS mit DctA-Punktmutanten .....	78
4.4.4 Interaktion von verkürzten DcuS-Varianten mit DctA.....	82
4.4.5 Interaktion von DcuS-Punktmutanten mit DctA .....	83
<b>4.5 BACTH: Interaktion von verkürztem DctA als MalE-Fusionsprotein mit DcuS</b> .....	<b>87</b>
4.5.1 MalE-Fusionsproteine und deren funktionaler Export in das Periplasma .....	87
4.5.2 Interaktion der C-terminalen Region von DctA mit DcuS .....	89
<b>4.6 BACTH: Effekt von Fumarat auf die Interaktion von DctA mit DcuS</b> .....	<b>91</b>
4.6.1 Fumaratabhängigkeit der Interaktion von DctA mit DcuS.....	91
4.6.2 Fumaratabhängigkeit der Interaktion von DctA mit DcuS-Punktmutanten.....	93
4.6.3 Fumaratabhängigkeit der Interaktion von DctA mit DctA .....	94
<b>4.7 BACTH: Interaktion von DcuS mit DcuB</b> .....	<b>96</b>
4.7.1 Interaktion von DcuS mit DcuB .....	96
4.7.2 Regulation von DctA- bzw. DcuB-Deletionsstämmen durch plasmidkodiertes DcuB .....	99
<b>4.8 BACTH: Interaktion von DctA mit DctA (Homodimerisierung)</b> .....	<b>101</b>
4.8.1 Interaktion von DctA-Fusionsproteinen .....	101
4.8.2 Funktionskontrolle der DctA-T25- und T18-Fusionsproteine .....	102
4.8.3 Interaktion von C-terminal verkürzten DctA-Varianten.....	103
4.8.4 Funktionskontrolle der verkürzten DctA-T25- und T18-Fusionsproteine .....	105
4.8.5 Interaktion von DctA-Punktmutanten mit DctA.....	106
4.8.6 Funktionskontrolle von DctA-Einzelmutanten.....	111
4.8.7 Regulation von DctA- bzw. DcuB-negativen Stämmen durch plasmidkodiertes DctA .....	112
<b>4.9 BACTH: Interaktion von verkürztem DctA als MalE-Fusionsprotein mit DctA (Homodimerisierung)</b> .....	<b>115</b>
<b>4.10 BACTH: Interaktion von DcuS mit DcuS (Homodimerisierung)</b> .....	<b>116</b>
4.10.1 Interaktion von DcuS-Fusionsproteinen .....	116
4.10.2 Regulation eines DcuS-Deletionsstamms durch plasmidkodiertes DcuS.....	118
<b>4.11 BACTH: Interaktion und Kontrollen verschiedener Proteine</b> .....	<b>119</b>

<b>4.12 Überproduktion, <i>in vivo</i> Cross-Linking und Lokalisation von DctA.....</b>	<b>122</b>
4.12.1 Überproduktion und Nachweis von DctA.....	122
4.12.2 Protein-Protein-Interaktionen: <i>In vivo</i> Cross-Linking von DctA durch DSS.....	125
4.12.3 Nachweis der Membranintegration von DctA durch Saccharosegradientenultrazentrifugation .....	128
4.12.4 Nachweis der Membranintegration von DctA durch Fluoreszenzmikroskopie .....	132
<b>4.13 Transkription des putativen Transporters YfcC aus <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>135</b>
<b>4.14 Wachstum von YfcC Einfach- und Mehrfachmutanten .....</b>	<b>136</b>
4.14.1 Stammkonstruktion der Keio Collection <i>yfcC</i> -Einzeldelentionsmutante zu Mehrfachmutanten.....	137
4.14.2 Stammspezifische Unterschiede im Wachstum von YfcC-negativen Stämmen.....	138
4.14.3 Wachstum von YfcC und ActP Einfach- und Doppel-Deletionsmutanten der Keio Stämme .....	140
4.14.4 Vergleich von YfcC-Deletionsmutanten verschiedener Stämme.....	141
<b>4.15 Transport von [<sup>14</sup>C]-Acetat durch YfcC und ActP in Keio Stämmen .....</b>	<b>142</b>
4.15.1 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Acetataufnahme durch YfcC .....	143
4.15.2 Konkurrenz der Acetataufnahme durch einen Überschuss alternativer Substrate .....	145
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>147</b>
<b>5.1 Topologie von DctA .....</b>	<b>147</b>
<b>5.2 Vorhersage der Tertiärstruktur und Substratbindung von DctA .....</b>	<b>151</b>
<b>5.3 Interaktionen und Funktionen von DctA .....</b>	<b>156</b>
5.3.1 DctA und DcuB als Co-Sensoren von DcuS.....	156
5.3.2 Funktionale Protein-Protein-Interaktion von DctA mit DcuS.....	158
5.3.3 Rolle der cytosolischen Helix 8b .....	159
5.3.4 Fumaratabhängigkeit der DctA/DcuS-Interaktion .....	161
5.3.5 Homooligomerisierung und Quartärstruktur von DctA .....	162
<b>5.4 Interaktion und Funktion von DcuB .....</b>	<b>167</b>
<b>6 Literatur.....</b>	<b>169</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>180</b>
<b>8 Veröffentlichungen und Präsentationen.....</b>	<b>195</b>



# 1 Zusammenfassung

*Escherichia coli* kann C<sub>4</sub>-Dicarboxylate sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen zur Energiekonservierung nutzen. Die Synthese der beteiligten Transporter und Enzyme wird auf der Transkriptionsebene durch das Zweikomponentensystem DcuSR reguliert. DcuS ist der Sensor für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate. Der Antwortregulator DcuR wird von DcuS aktiviert und induziert die Expression des C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporters DctA unter aeroben Verhältnissen. Anaerob verstärkt DcuSR die Expression des Fumarat/Succinat-Antiporters DcuB, der Fumarase B und der Fumaratreduktase FrdABCD. DctA und DcuB agieren als Co-Sensoren von DcuS und üben einen negativen Effekt auf die Genexpression von *dctA* bzw. *dcuB* aus.

In dieser Arbeit wurde die Funktion von DctA und DcuB als Co-Sensoren von DcuS untersucht. Sowohl für DcuB als auch für DctA wurde eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit DcuS über ein bakterielles Two-Hybrid System nachgewiesen. DcuS bildete ein Transporter-Sensor-Cluster mit DctA und DcuB. C-terminale Verkürzung und die Mutagenese einzelner Aminosäuren der C-terminalen Helix 8b von DctA führten zu einem Verlust der Interaktion mit DcuS. Mit dieser Interaktion gingen sowohl die regulatorische Funktion als auch die Transportfunktion der Punktmutante DctA<sub>L414A</sub> verloren. Ein Verlust der Interaktion wurde ebenfalls zwischen einer konstitutiv aktiven DcuS-Mutante und wildtypischem DctA beobachtet. Ebenso zeigte sich eine partielle Reduktion der Interaktion von DcuS mit DctA, wenn DcuS nach der zweiten Transmembranhelix verkürzt wurde. Die Interaktion zwischen DcuS und DctA wurde durch den Effektor Fumarat modifiziert, ging aber nicht komplett verloren.

DctA konnte in verschiedenen Plasmidsystemen überproduziert werden und bildete Homotrimere. Die Topologie von DctA wurde mit experimentellen und *in silico* Methoden aufgeklärt. DctA ähnelt der Struktur und Topologie des Aminosäuretransporters Glt aus *Pyrococcus horikoshii*. DctA besitzt acht Transmembranhelices mit einem cytosolischen N- und C-Terminus sowie zwei Haarnadelschleifen. Die Substratbindung findet höchstwahrscheinlich in den Haarnadelschleifen statt und der Transport erfolgt nach dem „alternating access“ Modell.

Außerdem wurde die Funktion des Transporters YfcC untersucht. Das Gen *yfcC* wurde mit Schlüsselgenen des Acetatstoffwechsels co-transkribiert. In *yfcC*-Deletionsstämmen zeigte sich ein stammspezifischer Defekt bei Wachstum mit Acetat und Transport von Acetat.

# 1 Summary

*Escherichia coli* is able to use C<sub>4</sub>-dicarboxylates for energy conservation under aerobic and anaerobic conditions. Synthesis of the involved transporters and enzymes is regulated on the transcription level by the DcuSR two-component system. DcuS is the C<sub>4</sub>-dicarboxylate-sensor. The response regulator DcuR is activated by DcuS and induces the expression of several target genes. In aerobiosis, expression of the C<sub>4</sub>-dicarboxylate-transporter DctA is increased. In anaerobiosis, the expression of the fumarate/succinate-Antiporter DcuB, the Fumarase B and the fumarate reductase FrdABCD is enhanced. DctA and DcuB both act as co-sensors for DcuS and repress the gene expression of *dctA* or *dcuB*, respectively.

In this work the role of DctA and DcuB as co-sensors for DcuS was investigated. A direct protein-protein-interaction between DctA as well as DcuB with DcuS was confirmed with a bacterial two-hybrid system. DcuS formed a transporter-sensor-cluster with DctA and DcuB. Truncation and single amino acid mutagenesis of the C-terminal DctA helix 8b resulted in a loss of interaction with DcuS. Additionally, regulatory and transport function were lost in the single mutant DctA<sub>L414A</sub>. A loss of interaction was also observed between a constitutively active DcuS point mutant and DctA. The interaction of DcuS with DctA was reduced when DcuS was truncated after its second transmembrane helix. The substrate fumarate modified but did not abolish the interaction between DcuS and DctA.

DctA was overproduced in several plasmid systems and formed homotrimers. The topology of DctA was analysed by experimental and *in silico* methods. DctA has a structure and topology similar to the amino acid transporter Glt from *Pyrococcus horikoshii*. It consists of eight transmembrane helices with the N- and C-terminus located in the cytoplasm and two hairpin loops. The substrate binding site is most probably located in the hairpin loops and substrate transport occurs according to the “alternating access” model.

Additionally, the function of the putative transporter YfcC was investigated. The gene *yfcC* was co-transcribed with key genes of the acetate metabolism. Its deletion mutants showed a strain specific defect in growth on acetate and transport of acetate.



## 2 Einleitung

### 2.1 Genregulation des Energiestoffwechsels in *Escherichia coli*

Viele Bakterien sind ständig wechselnden äußeren Umweltbedingungen unterworfen und besitzen daher eine hohe Anpassungsfähigkeit. *Escherichia coli* gehört zu den gramnegativen Enterobakterien, kann mit oder ohne Sauerstoff wachsen und ernährt sich von einer Vielzahl verschiedener Substrate. Diese Variabilität macht es notwendig, dass sich der Stoffwechsel von *E. coli* auf die veränderten Umweltbedingungen einstellt. Die für die Energiekonservierung verwendeten Elektronenakzeptoren unterscheiden sich in ihrer Energieausbeute und die Expression der benötigten Enzyme und Transporter ist deshalb hierarchisch reguliert. Sauerstoff ist der bevorzugte Elektronenakzeptor und reprimiert die Expression anaerober Stoffwechselwege. Glukose ist in Anwesenheit von Sauerstoff die bevorzugte Kohlenstoff- und Energiequelle und reprimiert die Aufnahme alternativer Substrate. Ist wenig Glukose vorhanden, bildet cAMP einen Komplex mit CRP (= cAMP receptor protein). Der cAMP-CRP-Komplex stimuliert die Expression alternativer Wege des Energiestoffwechsels als Transkriptionsfaktor. Unter anderem kann *E. coli* aerob mit C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten wie Fumarat, Succinat oder Malat wachsen. Die C<sub>4</sub>-Dicarboxylate werden in den Citratzyklus eingeschleust und zu CO<sub>2</sub> oxidiert oder für den Baustoffwechsel verwendet.

In Abwesenheit von Sauerstoff ( $E_0' = + 0,82 \text{ V}$ ) können alternative externe Elektronenakzeptoren in der anaeroben Atmung verwendet werden. Die Wahl des Elektronenakzeptors unter Anaerobiose folgt dem Redoxpotential. So wird Nitrat ( $E_0' = + 0,43 \text{ V}$ ) bevorzugt, gefolgt von DMSO ( $E_0' = + 0,16 \text{ V}$ ), TMAO ( $E_0' = + 0,13 \text{ V}$ ) und schließlich Fumarat ( $E_0' = + 0,03 \text{ V}$ ). Die Expression der terminalen Atmungskettenenzyme wird auf der Transkriptionsebene reguliert. Das Fehlen von Sauerstoff führt zu einer Aktivierung des Einkomponentensystems FNR (Unden und Trageser, 1991; Shaw und Guest, 1982) und des Zweikomponentensystems ArcBA (Iuchi et al., 1992). In seiner aktiven anaeroben Form reprimiert ArcBA die Expression der Enzyme des aeroben Elektronentransports und des Citratzyklus. FNR dient als Aktivator vieler Gene der anaeroben Atmung. Die Zweikomponentensysteme NarXL und NarQP stimulieren die Gene der Nitratatmung in Anwesenheit von Nitrat, während die Gene alternativer anaerober Atmungsformen und die der Fermentation reprimiert werden (Stewart, 1993; Rabin und Stewart, 1993).

Sind keine externen Elektronenakzeptoren vorhanden, werden die Elektronen in der gemischten Säuregärung auf Stoffwechselzwischenprodukte übertragen.

## 2.2 Wahrnehmung von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten und Genregulation durch DcuSR

Die Wahrnehmung von Umweltreizen erfolgt in *E. coli* oftmals durch Zweikomponentensysteme (Stock et al., 2000; Mascher et al., 2006). Diese Systeme bestehen aus einem Sensor und einem Antwortregulator. Die Anwesenheit eines Reizes wird durch eine spezielle Domäne im Sensor erkannt und führt zu einer Signalweiterleitung an den Antwortregulator. Dieser wird aktiviert und dient als Transkriptionsregulator für spezifische Zielgene.

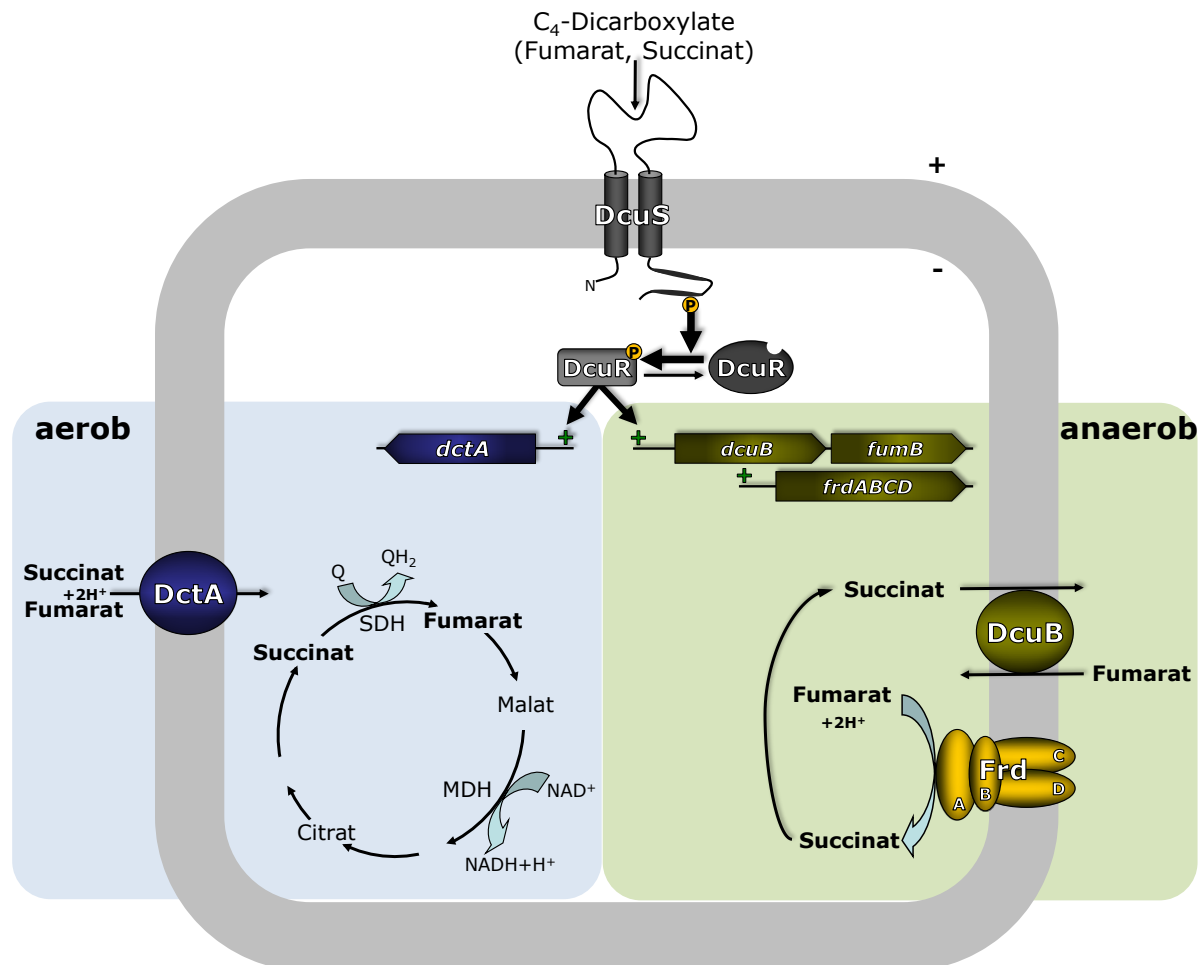


Abb. 1: Hauptwege für Erkennung, Transport und Stoffwechsel von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten in *E. coli*.

Das Zweikomponentensystem DcuSR (Dcu = Dicarboxylate uptake) besteht aus dem Sensor DcuS und dem Antwortregulator DcuR. DcuS besitzt eine periplasmatische Sensordomäne PAS<sub>P</sub>, die C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren detektiert und das Signal über die Membran weiterleitet (Janausch et al., 2002; Etzkorn et al., 2008). Im Cytoplasma befindet sich eine weitere PAS-Domäne (PAS<sub>C</sub>), die das eingehende Signal moduliert und an die Kinasedomäne weiterleitet (Degreif-Dünnwald, 2011). Die Kinasedomäne wird an einem konservierten Histidinrest

autophosphoryliert. Der Phosphatrest wird auf ein ebenfalls konserviertes Aspartat in DcuR übertragen. Die phosphorylierte Form von DcuR ist als Transkriptionsfaktor aktiv und steigert die Expression verschiedener Zielgene. Die Expression von *dctA* (C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter) wird aerob aktiviert; anaerob werden die Gene des C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Antiporters *dcuB*, der Fumarase B (*fumB*) und des Fumaratreduktase-Operons (*frdABCD*) verstärkt exprimiert (Abb. 1).

### 2.3 Transport und Metabolismus von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten in *Escherichia coli*

Die Existenz eines aeroben Transporters für C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren in *E. coli* wurde erstmals 1969 durch Kay und Kornberg postuliert und es wurde die Bezeichnung Dct (dicarcoxylate transporter) eingeführt. Der Transporter kann Fumarat aufnehmen. Diese Fumarataufnahme wird kompetitiv durch Succinat, Malat und Aspartat gehemmt. Glutamat, Oxoglutarat, Asparagin, Laktat, Acetat und Pyruvat führen zu keiner Hemmung (Kay und Kornberg et al., 1969; Davies et al., 1999). Die Affinität des Dct Systems beträgt 10 bis 20 µM für Succinat; die Aufnahme erfolgt als sekundärer Transport im Symport mit 2 Protonen (Gutowski und Rosenberg, 1975). Aufgenommene C<sub>4</sub>-Dicarboxylate akkumulieren nicht in der Zelle, sondern werden direkt verstoffwechselt (Kay et al., 1971). Erst eine Deletion der Succinatdehydrogenase führt zu einer Anhäufung von Fumarat in der Zelle (Lo et al., 1972). Es wurde ein zweites Aufnahmesystem Cbt mit einem periplasmatischen Bindeprotein vorgeschlagen (Lo et al., 1975), dessen Existenz aber nicht bestätigt werden konnte.

Der Transporter Dct wurde auf dem Chromosom bei 79,3 Minuten identifiziert und *dctA* benannt (Davies et al., 1999). DctA ist der aerobe Haupttransporter für Fumarat, Succinat und Malat. Eine Deletion von *dctA* führt zu einem Wachstumsverlust mit Fumarat, Malat oder Succinat als einziger Kohlenstoffquelle; wohingegen mit den Substraten Glukose, Fruktose, Glycerin, Laktat und Acetat weiterhin Wachstum besteht. Der Wachstumsverlust mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle ist nicht vollständig, so dass ein weiterer unbekannter Transporter vorgeschlagen wird. Das *dctA*-Gen liegt monocistronisch vor und seine Expression wird durch mehrere Faktoren reguliert. Die Expression von *dctA* erfolgt nur aerob; unter anaeroben Bedingungen wird seine Transkription durch ArcBA und FNR reprimiert. Unter aeroben Bedingungen in Abwesenheit von Glukose oder bei künstlicher Zugabe von cAMP wird die Expression von *dctA* durch CRP-cAMP gesteigert. Die Induktion von *dctA* erfolgt hauptsächlich in der stationären Phase (19-fache Aktivierung) durch Fumarat, Succinat,

Malat, Aspartat und Citrat. Die Deletion von *dctA* führt zu einer konstitutiven Aktivität des *dctA*-Promotors. In der Anwesenheit von C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren induziert das DcuSR Zweikomponentensystem die Expression von *dctA* (Abb. 1). Eine Deletion der Sensorkinase DcuS führt zu einer sehr niedrigen Expression von *dctA*. Somit spielt DctA wahrscheinlich eine Rolle als Co-Sensor von DcuS. Es konnten zwei Bindestellen für den Antwortregulator DcuR im Promotorbereich von *dctA* identifiziert werden (Abo-Amer et al., 2004).

Anaerob sind mehrere Transporter für C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren bekannt. In der Fumaratatmung können alle intermediären C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren außer Succinat als Endelektronenakzeptoren verwendet werden, wenn ein zusätzlicher Wasserstoffdonor vorhanden ist. Nach der Aufnahme werden sie enzymatisch zu Fumarat umgesetzt, welches dann durch die Fumarat-reduktase (FrdABCD) unter Generierung eines Protonenpotentials zu Succinat reduziert und anschließend exkretiert wird (Abb. 1). Die Energiegewinnung erfolgt durch die Hydrogenase II (HybAB) oder die NADH-Dehydrogenase I (NuoA-N). Der Antiporter TtdT importiert Tartrat im Austausch mit Succinat (Kim et al., 2007). CitT ist ebenfalls ein Antiporter, importiert jedoch die C<sub>6</sub>-Tricarbonsäure Citrat im Austausch mit Succinat. Citrat wird in der Citratfermentation zu den beiden Endprodukten Succinat und Acetat umgewandelt (Pos et al., 1998). DcuA importiert Fumarat im Symport mit Protonen (Engel et al., 1992), während DcuC ein Exporter für Succinat ist, der durch FNR unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird und keiner Katabolitrepression unterliegt (Zientz et al., 1999). DcuC zeigt eine Homologie mit dem kryptischen Transporter DcuD (Janausch et al., 1999).

Der Haupttransporter für C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren unter anaeroben Bedingungen ist DcuB. DcuB transportiert Fumarat, Aspartat und Malat mit einer Affinität von 100 µM durch einen Antiport gegen Succinat in die Zelle (Engel et al., 1994). Die Genexpression von *dcuB* wird unter anaeroben Bedingungen durch FNR und CRP-cAMP stimuliert (Spiro et al., 1990; Zheng et al., 2004) und über das NarXL-Zweikomponentensystem durch Nitrat reprimiert (Darwin et al., 1995). Weiterhin wird die *dcuB*-Transkription durch das DcuSR Zweikomponentensystem in der Anwesenheit von C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren aktiviert (Abb. 1). Chromosomale Deletion der Sensorkinase DcuS führt zu einer stark reduzierten Transkription von *dcuB*. DcuB ist nicht nur ein Transporter für C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren, er besitzt zusätzlich eine regulatorische Funktion. Die Deletion von *dcuB* führt, ähnlich wie bei *dctA*, zu einer konstitutiven Aktivität des *dcuB*-Promotors. Die Transport- und die Regulationsfunktion von DcuB sind weitgehend unabhängig voneinander (Kleefeld et al., 2009).

Der Mechanismus der Aktivität von DcuB als Co-Sensor ist unbekannt, jedoch wird eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit DcuS vermutet.

## 2.4 Transport und Regulation von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten durch DctA-Homologe

DctA ist ein Mitglied der DAACS-Familie (= dicarboxylate amino acid:cation symporter), welche C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren oder Aminosäuren im Symport mit H<sup>+</sup> oder Na<sup>+</sup> transportiert. Diese Familie umfasst alle DctA-Transporter sowie Aminosäuretransporter aus allen Reichen des Lebens. Unter anderem gehören auch der Glutamat-/Aspartat-Transporter aus *Pyrococcus horikoshii* (Glt<sub>Ph</sub>), *Bacillus subtilis* (GltP<sub>Bs</sub>) und *Escherichia coli* (GltP<sub>Ec</sub>) sowie die humanen exzitatorischen Aminosäuretransporter (EAAT1-4<sub>Hs</sub>) zu dieser Familie (Abb. 2).

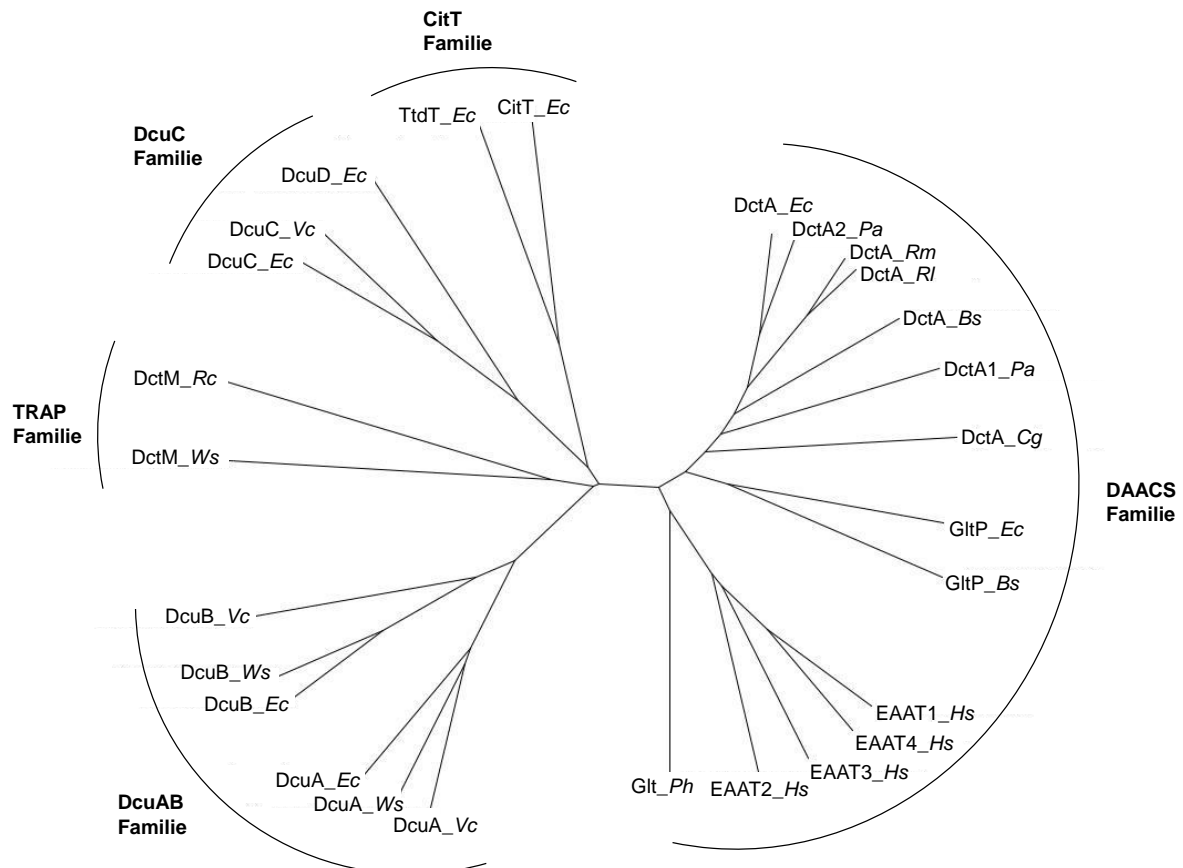


Abb. 2: **Phylogenetischer Stammbaum von C<sub>4</sub>-Dicarbonsäure- und Aminosäuretransportern.** C<sub>4</sub>-Dicarboxylate werden mit unterschiedlicher Spezifität durch Transporter der DcuAB-, DcuC-, TRAP-, CitT- und DAACS-Familie transportiert. *Bs* = *Bacillus subtilis*, *Cg* = *Corynebacterium glutamicum*, *Ec* = *Escherichia coli*, *Hs* = *Homo sapiens*, *Pa* = *Pseudomonas aeruginosa*, *Rl* = *Rhizobium leguminosarum*, *Rm* = *Rhizobium meliloti*, *Vc* = *Vibrio cholerae*, *Ws* = *Wolinella succinogenes*. Sequenzvergleich mit Hilfe von ClustalW2 (Larkin et al., 2007) und Archaeopteryx (Han und Zmasek, 2009).

Alle Transporter der DAACS-Familie zeichnen sich durch ein spezifisches Sequenzmotiv aus. Es gibt einige Untersuchungen zu homologen Transportern von DctA, die im Folgenden kurz zusammengefasst sind.

*Rhizobium meliloti* ist ein gramnegatives alpha-Proteobakterium, das eine Symbiose mit Leguminosen eingehen kann (Yurgel et al., 2004). Als Symbiont nutzt es die vom Wirt gelieferten C<sub>4</sub>-Dicarboxylate zum Wachstum und liefert der Pflanze im Austausch durch Stickstofffixierung gewonnenes Ammoniak. Der aerobe Transporter für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate von *Rhizobium meliloti* (DctA<sub>Rm</sub>) ist DctA. Das *dctA*-Gen liegt auf einem Megaplasmid. Alle Rhizobien besitzen DctA, dessen Expression durch das DcuSR-homologe Zweikomponentensystem DctBD reguliert wird. Rhizobiales DctA ist ebenso wie DctA aus *E. coli* als Co-Sensor an seiner eigenen Regulation beteiligt. Es erhöht die Spezifität von DctBD und verhindert so einen Cross-Talk. DctB besitzt im Vergleich zu DcuS aus *E. coli* eine zusätzliche periplasmatische PAS-Domäne, aber es ist nur eine PAS-Domäne an der Substratbindung beteiligt (Zhou et al., 2008).

*Corynebacterium glutamicum* besitzt ein DctA-Protein (DctA<sub>Cg</sub>), jedoch ist seine wildtypische Expression zu gering für ein Wachstum auf C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten. Die Überexpression von DctA reicht aus, um ein Wachstum auf C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren zu ermöglichen (Youn et al., 2009). DctA<sub>Cg</sub> besitzt eine sehr ähnliche Substratspezifität wie DctA aus *E. coli*.

In *Bacillus subtilis* gibt es ebenfalls ein homologes DctA (DctA<sub>Bs</sub>). Es besitzt eine sehr ähnliche Substratspezifität wie DctA aus *E. coli* und transportiert die Substrate im Symport mit 3 H<sup>+</sup>. Anders als bei den Glutamat-Transportern wird kein Na<sup>+</sup> für den Transport benötigt.

Auch *Pseudomonas aeruginosa* besitzt einen DctA-Transporter (DctA2<sub>Pa</sub>). Dieser verfügt über eine ähnliche Substratspezifität und Regulation wie DctA aus *E. coli*. Zusätzlich existiert ein TRAP-Transporter für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate, der aber keinen regulatorischen Einfluss besitzt (Valentini et al., 2011).

TRAP-Systeme (= Tripartite ATP-independent periplasmic) für den Transport von C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren sind nicht homolog zu DctA-Transportern. Sie bestehen aus einem periplasmatischen Bindeprotein zur Substratbindung, sowie aus einer kleinen und einer großen Transporteruntereinheit. Beispiele für den TRAP-Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten sind aus *Aromatoleum aromaticum* (Trautwein et al., 2012), *Rhodobacter capsulatus* (Forward et al., 1997) und *Wolinella succinogenes* (Ullmann et al., 2000) bekannt.

## 2.5 Metabolismus und Transport von Acetat in *Escherichia coli*

Unter aeroben Bedingungen oxidiert *E. coli* Glukose in der Glykolyse zu Pyruvat. Pyruvat wird anschließend mit HS-CoA oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Der Acyl-Rest wird im Citratzyklus komplett oxidiert. Ein Überschuss von Glukose führt zu einer Bildung von mehr Acetyl-CoA als im Citratzyklus verwendet werden kann. In diesem Fall kann Acetyl-CoA durch die Phosphotransacetylase (Pta) und durch die Acetatkinase (AckA) unter Bildung eines ATP zu Acetat umgewandelt und anschließend aus der Zelle ausgeschieden werden (Abb. 3; Kumari et al., 2000). Diese unvollständige Oxidation wird als Überflusstoffwechsel bezeichnet. Ausgeschiedenes Acetat kann wieder aufgenommen werden, sobald die Glukosekonzentration sinkt (Wolfe et al., 2005). Acetat ist aerob als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle ausreichend und kann durch zwei verschiedene Mechanismen in den Citratzyklus eingeschleust werden. Bei niedrigen Acetatkonzentrationen wird Acetat durch Acs in einer irreversiblen Reaktion mit geringer Geschwindigkeit zu Acetyl-CoA umgewandelt. Bei hohen Acetatkonzentrationen wird die Reaktion in zwei Schritten von AckA und Pta durchgeführt; diese Reaktion ist reversibel.

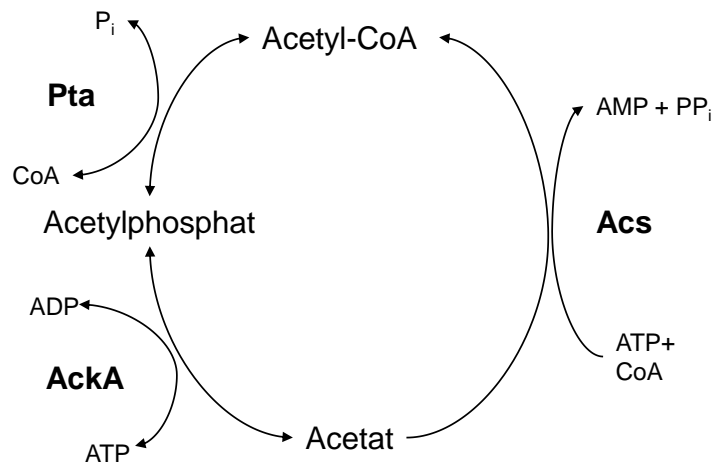


Abb. 3: **Funktionen von AckA, Pta und Acs im Acetatstoffwechsel von *E. coli*.**  
(Geändert nach Kumari et al., 2000).

Anaerob führt *E. coli* mit Glukose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle eine gemischte Säuregärung durch. In der Glykolyse erfolgt der Abbau von Glukose zu Pyruvat, das durch die Pyruvat-Formiat-Lyase zu Acetyl-CoA und Formiat umgewandelt wird. Aus Acetyl-CoA wird anschließend Acetat durch Pta und AckA unter Gewinn eines ATP gebildet und dann

ausgeschieden. Als weitere Produkte entstehen neben Acetat noch Succinat, Formiat, Ethanol, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>. Acs spielt im anaeroben Stoffwechsel keine Rolle und wird nur aerob exprimiert.

Essigsäure kann in seiner protonierten Form in gewissem Umfang durch die Zellmembran diffundieren. Im Vergleich zu einem aktiven Transport bei einem neutralen pH-Wert ist der Umfang der Diffusion jedoch relativ gering. Der einzige bisher bekannte Acetat-Transporter in *E. coli* ist ActP (Gimenez et al., 2003). Das Gen *actP* bildet ein Operon mit dem stromaufwärts liegenden *acs*. Unter aeroben Bedingungen ist ActP der Haupttransporter von Acetat. Die Restaktivität einer ActP-Deletionsmutante deutet aber auf die Existenz eines zweiten Transporters hin.

Ein zweiter Acetat-Transporter, auf den diese Restaktivität zurückzuführen sein könnte, ist YfcC. Es zeigt eine geringe Homologie zu den Transportern der DcuC-Familie (14 % Identität zu DcuC). Interessanterweise liegt *yfcC* stromabwärts der Gene von *ackA* und *pta* und könnte vielleicht mit ihnen co-transkribiert werden.

## 2.6 Ziele dieser Arbeit

DctA und DcuB agieren beide als Co-Sensoren für das Zweikomponentensystem DcuSR (Davies et al., 1999). Obwohl es immer mehr Hinweise gibt, dass membranständige Sensorinasen Co-Sensoren in Form von sekundären Transportern verwenden, ist bisher nicht bekannt, wie diese Transporter als Co-Sensoren arbeiten. Es sollte deshalb zunächst gezeigt werden, ob die Sensorkinase DcuS mit den Transportern DctA und DcuB in Wechselwirkung steht. Dafür wurde das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System als Hauptmethode eingesetzt, mit dem sich Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen *in vivo* untersuchen lassen. Durch Punkt- und Deletionsmutanten sollte dann versucht werden, die Domänen für die Interaktion von DctA mit DcuS zu identifizieren.

Die Struktur von DctA sollte durch Topologieuntersuchungen bestimmt werden. Der DctA-homologe Transporter Glt<sub>Ph</sub> aus *Pyrococcus horikoshii* ist in seiner Struktur und Funktion gut erforscht. Die Untersuchung der Interaktionsdomäne und der Topologie von DctA sollte, unter Berücksichtigung der Kenntnisse von der Funktion des homologen Proteins Glt<sub>Ph</sub>, Hinweise auf die Funktionsweise von DctA als Co-Sensor liefern.



### 3 Material und Methode

#### 3.1 Verwendete Stämme und Plasmide von *Escherichia coli*

Tab. 1: Verwendete Stämme von *Escherichia coli* K12.

Stamm	Genotyp	Referenz
AJW678	<i>thi-1, thr-1 (Am), leuB6, metF159 (Am), rpsL136, ΔlacX74</i>	Kumari, 2000
AJW2959	AJW678, aber <i>yfcC::kan<sup>r</sup></i>	Wolfe, unveröffentlicht
AN387	Wildtyp	Wallace & Young, 1977
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F, <i>ompT, hsdS<sub>B</sub>gal1, dcm</i> λ(DE3), mit IPTG-induzierbarer chromosomaler T7-RNA-Polymerase; Proteinüberproduktionsstamm	Studier & Moffat, 1986
BTH101	Reporterstamm <i>cya<sup>-</sup></i> Two-Hybrid System, <i>Rec<sup>+</sup></i> , F, <i>cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Strr), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	Karimova et al., 1998
BW25113	<i>Δ(araD-araB)56, ΔlacZ4787(::rmB-3), λ<sup>-</sup>, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514</i>	Keio Collection
CC181	<i>F128lacIq, Δ(ara,leu)7679, ΔlacX74, ΔphoA20, galE, galK, thi, rpsE, rpoB, argEam, lacY328am, recA1</i>	Calamia & Manoil, 1986
C43(DE3)	spontane Mutation von BL21(DE3) zur Überproduktion von Membranproteinen	Miroux & Walker, 1996
IMW237	MC4100, aber λ[(Φ( <i>dcuB-lacZ</i> )hyb, <i>amp<sup>r</sup></i> )]	Zientz et al., 1998
IMW260	MC4100, aber λ[(Φ( <i>dcuB-lacZ</i> )hyb, <i>amp<sup>r</sup></i> ), <i>dcuS::cam<sup>r</sup></i> ]	Zientz et al., 1998
IMW385	MC4100, λ[(Φ <i>dctA-lacZ</i> ) hyb, <i>amp<sup>r</sup></i> ]	Kleefeld, 2002
IMW386	P1 (MDO800) x IMW385 λ [(Φ <i>dctA-lacZ</i> ) hyb, <i>amp<sup>r</sup></i> ], <i>dctA::spc<sup>r</sup></i>	Kleefeld, 2002
IMW389	P1 (IMW260) x IMW385 λ [(Φ <i>dctA-lacZ</i> ) hyb, <i>amp<sup>r</sup></i> ], <i>dcuS::cam<sup>r</sup></i>	Kleefeld, 2002
IMW398	P1 (MDO800) x IMW237, λ [(Φ( <i>dcuB-lacZ</i> ) hyb, <i>amp<sup>r</sup></i> ), <i>dctA::spc<sup>r</sup></i> ]	Kleefeld, 2002
IMW503	MC4100, λ [(Φ <i>dcuB-lacZ</i> ) hyb, <i>amp<sup>r</sup></i> ], <i>ΔdcuB</i>	Kleefeld, 2006
IMW505	P1 (IMW157) x IMW504 λ[(Φ <i>dcuB-lacZ</i> ) hyb, <i>amp<sup>r</sup></i> ], <i>dcuA::spc<sup>r</sup>, ΔdcuB, dcuC::cam<sup>r</sup></i>	Kleefeld, 2006
IMW539	P1 (JRG2813) x IMW385 λ[(Φ <i>dctA-lacZ</i> ) hyb, <i>amp<sup>r</sup></i> ], <i>dcuB::kan<sup>r</sup></i>	Kleefeld, 2006
IMW556	JW2217, aber <i>ΔatoE</i> (keine Resistenz)	Diese Arbeit
IMW557	JW2295, aber <i>ΔyfcC</i> (keine Resistenz)	Diese Arbeit
IMW558	P1(IMW556) x JW2295, <i>yfcC::kan<sup>r</sup>, ΔatoE</i>	Diese Arbeit
IMW559	P1(IMW557) x JW4028, <i>actP::kan<sup>r</sup>, ΔyfcC</i>	Diese Arbeit
IMW560	P1(IMW556) x JW4028, <i>actP::kan<sup>r</sup>, ΔatoE</i>	Diese Arbeit

IMW561	IMW558, aber $\Delta actP$ , $\Delta yfcC$ (keine Resistenz)	Diese Arbeit
IMW562	P1(IMW561) x JW4028, $actP::kan^r$ , $\Delta yfcC$ , $\Delta atoE$	Diese Arbeit
JM109	$recA1$ , $supE44$ , $endA1$ , $hsdR17$ , $gyrA96$ , $relA1$ , $thi \Delta(lac-proAB)$ , F'[ $traD36 proAB^+$ , $lacI^q lacZ\Delta M15$ ]	Yanisch-Perron et al., 1985
JW2217	BW25113, aber $atoE::kan^r$	Keio Collection
JW2295	BW25113, aber $yfcC::kan^r$	Keio Collection
JW4028	BW25113, aber $actP::kan^r$	Keio Collection
MC4100	F, $araD139 \Delta(argF-lac)U169$ , $rpsL150$ , ( $\Delta lacZ$ ), $relA1$ , $flbB530$ , $deoC1$ , $ptsF25$ , $rbsR$	Silhavy et al., 1984
MDO800	AN387, aber $dctA::spc^r$	Six et al., 1994
MG1655	CGSC 6300, $fnr^-$ , $\lambda$ -F-P1-sensitiv	Jensen, 1993
NT326	F, $araD139 \Delta lacU169 rpsL thi \Delta malE444 recA1$	Treptow & Schuman, 1985
XL1-Blue	F, $recA1^-$ , ( $mk^+$ , $rk^-$ ) $supE44$ , $endA1$ , $thi-1$ , $\lambda^-$ , $gyrA96$ , $relA1$ , ( $lac^-$ ) [F-, $proAB$ , $lacI^q$ , Z $\Delta M15 Tn10(tet^r)$ ] Stamm zur gerichteten Mutagenese	Stratagene

Tab. 2: **Verwendete Viren.**

Stamm	Genotyp	Referenz
P1kc	Bakteriophage für <i>E. coli</i> Infektion	Miller, 1992

Tab. 3: **Ausgangsplasmide und Plasmide für Klonierung, Expression und Komplementation.** Das exprimierte Protein ist angegeben.

Stamm	Plasmidbeschreibung	Referenz
<b>Ursprungsplasmide</b>		
pASK-IBA3 <sup>+</sup>	Expressionsvektor für Fusionen mit C-terminalem Strep-Tag, AHT-induzierbarer Promotor, $amp^r$	IBA, Göttingen
pASK-IBA33 <sup>+</sup>	Expressionsvektor für Fusionen mit C-terminalem His6-Tag, AHT-induzierbarer Promotor, $amp^r$	IBA, Göttingen
pBAD18K	Plasmid für die Genexpression unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren P <sub>BAD</sub> -Promotors, pBR322 ori, $kan^r$	Guzman et al., 1995
pBAD18K*	pBAD18K, aber eine <i>HindIII</i> -Schnittstelle deletiert, $kan^r$	Scheu et al., 2010a
pBAD30	Plasmid für die Genexpression unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren P <sub>BAD</sub> -Promotors, pACYC ori, $amp^r$	Guzman et al., 1995

pET28a	Expressionsvektor für Fusionen mit N- und C-terminalem His6-Tag, T7-Promotor, pBR322 ori, <i>kan<sup>r</sup></i>	Novagen
pCP20	Plasmid zur Eliminierung von Resistenzkassetten, $\lambda$ cI857(ts), <i>ts-rep</i> , <i>amp<sup>r</sup></i> , <i>cam<sup>r</sup></i>	Cherepanov et al., 1995

### DctA-Plasmide

pMW457	Expression von DctA mit natürlichem Promotor, pET28a-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Bauer, 2010
pMW1341	Expression von DctA <sub>L414A</sub> mit natürlichem Promotor, pMW457-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1342	Expression von DctA <sub>N415A</sub> mit natürlichem Promotor, pMW457-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1343	Expression von DctA <sub>N416A</sub> mit natürlichem Promotor, pMW457-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW505	Expression von DctA mit N- und C-terminalem His6-Tag, pET28a-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Bauer, 2010
pMW1024	Expression der cysteinfreien Variante DctA <sub>C55S,C225S,C230S,C285S</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW505-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1104	Expression von DctA mit C-terminalem Strep-Tag, pASK-IBA3 <sup>+</sup> -Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1194	Expression von DctA mit N- und C-terminalem His6-Tag, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1195	Expression von DctA mit N- und C-terminalem His6-Tag, pBAD30-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1196	Expression der cysteinfreien Variante DctA <sub>C55S,C225S,C230S,C285S</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1197	Expression der cysteinfreien Variante DctA <sub>C55S,C225S,C230S,C285S</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pBAD30-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1198	Expression von DctA mit C-terminalem Strep-Tag, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1199	Expression von DctA mit C-terminalem Strep-Tag, pBAD30-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1271	Expression von DctA <sub>L414A</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1272	Expression von DctA <sub>N415A</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1273	Expression von DctA <sub>N416A</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1274	Expression von DctA <sub>R417A</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1275	Expression von DctA <sub>A418S</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1276	Expression von DctA <sub>P419A</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1277	Expression von DctA <sub>D420A</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

pMW1476	Expression von DctA <sub>D406A</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1477	Expression von DctA <sub>L410A</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1484	Expression von DctA <sub>E404A</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1485	Expression von DctA <sub>L405A</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1503	Expression von DctA <sub>T305A</sub> mit N- und C-terminalem His6-Tag, pMW1194-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

#### **DcuB-Plasmide**

---

pMW619	Expression von DcuB mit C-terminalem His6-Tag, pASK-IBA33 <sup>+</sup> -Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Witan, 2008
pMW697	Expression von DcuB mit C-terminalem His6-Tag, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Witan, 2008
pMW561	Expression von DcuB-PhoA, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Bauer, 2010

#### **DcuS-Plasmide**

---

pMW151	Expression von DcuS mit N-terminalem His6-Tag, pET28a-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Janausch et al., 2002
pMW181	Expression von DcuS mit natürlichem Promotor, pET28a-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Kneuper et al., 2005
pMW1390	Expression von DcuS mit N-terminalem His6-Tag, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1391	Expression von DcuS mit N-terminalem His6-Tag, pBAD30-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

#### **YfcC-Plasmide**

---

pMW699	Expression von YfcC mit C-terminalem His6-Tag, pASK-IBA33 <sup>+</sup> -Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Witan, 2008
pMW716	Expression von YfcC mit C-terminalem His6-Tag, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Witan, 2008
pMW722	Expression von YfcC mit natürlichem Promotor und C-terminalem His6-Tag, pME6010-Derivat, <i>tet<sup>r</sup></i>	Witan, 2008

---

Tab. 4: Plasmide für die Topologiebestimmung von DctA. Das exprimierte Protein ist angegeben.

Stamm	Plasmidbeschreibung	Referenz
<b>Ausgangsplasmide</b>		
pT7-5-putP-lacZ	Plasmid für die Expression von PutP-LacZ, Quelle für <i>lacZ</i> ab Aminosäure 10, <i>amp<sup>r</sup></i>	Jung et. al., 1998
pT7-5-putP-phoA	Plasmid für die Expression von PutP-PhoA, Quelle für <i>phoA</i> ohne Exportsignal ab Aminosäure 27, <i>amp<sup>r</sup></i>	Jung et. al., 1998
pMW1105	<i>lacZ</i> für Topologiebestimmungen, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1106	<i>phoA</i> für Topologiebestimmungen, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
<b>DctA-LacZ-Fusionsplasmide</b>		
pMW1044	Expression von DctA <sub>1-215</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1045	Expression von DctA <sub>1-250</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1046	Expression von DctA <sub>1-323</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1047	Expression von DctA <sub>1-350</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1048	Expression von DctA <sub>1-380</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1049	Expression von DctA-LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i> , Volllängenkonstrukt	Diese Arbeit
pMW1114	Expression von DctA <sub>1-65</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1115	Expression von DctA <sub>1-105</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1116	Expression von DctA <sub>1-170</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1117	Expression von DctA <sub>1-200</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1118	Expression von DctA <sub>1-300</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1119	Expression von DctA <sub>1-403</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1128	Expression von DctA <sub>1-28</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1129	Expression von DctA <sub>1-131</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1130	Expression von DctA <sub>1-150</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1131	Expression von DctA <sub>1-180</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1132	Expression von DctA <sub>1-208</sub> -LacZ, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

pMW1133	Expression von DctA <sub>1-242</sub> -LacZ, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1134	Expression von DctA <sub>1-270</sub> -LacZ, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1135	Expression von DctA <sub>1-290</sub> -LacZ, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1136	Expression von DctA <sub>1-310</sub> -LacZ, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1137	Expression von DctA <sub>1-340</sub> -LacZ, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1138	Expression von DctA <sub>1-365</sub> -LacZ, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1139	Expression von DctA <sub>1-373</sub> -LacZ, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1140	Expression von DctA <sub>1-390</sub> -LacZ, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

### **DctA-PhoA-Fusionsplasmide**

---

pMW1050	Expression von DctA <sub>1-215</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1051	Expression von DctA <sub>1-250</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1052	Expression von DctA <sub>1-323</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1053	Expression von DctA <sub>1-350</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1054	Expression von DctA <sub>1-380</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1055	Expression von DctA-PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i> , Volllängenkonstrukt	Diese Arbeit
pMW1120	Expression von DctA <sub>1-65</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1121	Expression von DctA <sub>1-105</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1122	Expression von DctA <sub>1-170</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1123	Expression von DctA <sub>1-200</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1124	Expression von DctA <sub>1-300</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1125	Expression von DctA <sub>1-403</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1141	Expression von DctA <sub>1-28</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1142	Expression von DctA <sub>1-131</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1143	Expression von DctA <sub>1-150</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1144	Expression von DctA <sub>1-180</sub> -PhoA, pBAD18K*- Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

pMW1145	Expression von DctA <sub>1-208</sub> -PhoA, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1146	Expression von DctA <sub>1-242</sub> -PhoA, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1147	Expression von DctA <sub>1-270</sub> -PhoA, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1148	Expression von DctA <sub>1-290</sub> -PhoA, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1149	Expression von DctA <sub>1-310</sub> -PhoA, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1150	Expression von DctA <sub>1-340</sub> -PhoA, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1151	Expression von DctA <sub>1-365</sub> -PhoA, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1152	Expression von DctA <sub>1-373</sub> -PhoA, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1153	Expression von DctA <sub>1-390</sub> -PhoA, pBAD18K*-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

Tab. 5: **Plasmide für das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System.** Das exprimierte Protein ist angegeben.

Stamm	Plasmidbeschreibung	Referenz
<b>Ausgangsplasmide</b>		
pKNT25	Plasmid für die Expression von C-terminalen T25-Fusionen, pSU40 Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	BACTH manual, Karimova et al., 2005
pKT25	Plasmid für die Expression von N-terminalen T25-Fusionen, pSU40 Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	BACTH manual, Karimova et al., 2005
pUT18	Plasmid für die Expression von C-terminalen T18-Fusionen, pUC19 Derivat <i>amp<sup>r</sup></i>	BACTH manual, Karimova et al. 2005
pUT18C	Plasmid für die Expression von N-terminalen T18-Fusionen, pUC19 Derivat <i>amp<sup>r</sup></i>	BACTH manual, Karimova et al., 2005
pKT25-zip	Expression von T25-Zip, Leucine-Zipper von GCN4, pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Karimova et al., 1998
pUTC18-zip	Expression von T18-Zip, Leucine-Zipper von GCN4, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Karimova et al., 1998
<b>CitA-Plasmide</b>		
pMW1025	Expression von T18-CitA, pUT18C-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Scheu et al., 2011
pMW1026	Expression von CitA-T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
<b>CitB-Plasmide</b>		
pMW1358	Expression von CitB-T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1359	Expression von T25-CitB, pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

pMW1442	Expression von T18-CitB, pUT18C-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
---------	---	--------------

### DctA-Plasmide

---

#### Volllängen-DctA

pMW856	Expression von T25-DctA, pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW858	Expression von DctA-T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW917	Expression von T18-DctA, pUT18C-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW918	Expression von DctA-T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

#### Verkürztes DctA

pMW931	Expression von DctA <sub>1-215</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW932	Expression von DctA <sub>1-250</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW933	Expression von DctA <sub>1-323</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW934	Expression von DctA <sub>1-350</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW935	Expression von DctA <sub>1-380</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1002	Expression von T25-DctA <sub>36-428</sub> , pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1003	Expression von T25-DctA <sub>73-428</sub> , pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1004	Expression von T25-DctA <sub>124-428</sub> , pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1005	Expression von T25-DctA <sub>168-428</sub> , pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1126	Expression von DctA <sub>400-428</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1175	Expression von DctA <sub>1-403</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1176	Expression von DctA <sub>1-413</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1177	Expression von DctA <sub>1-420</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1178	Expression von DctA <sub>1-403</sub> -T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1179	Expression von DctA <sub>1-413</sub> -T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1180	Expression von DctA <sub>1-420</sub> -T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1227	Expression von DctA <sub>400-428</sub> -T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit



pMW1303	Expression von DctA <sub>1-415</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1392	Expression von DctA <sub>1-415</sub> -T18, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1641	Expression von DctA <sub>362-428</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1643	Expression von DctA <sub>362-428</sub> -T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1647	Expression von MalE-DctA <sub>362-428</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1648	Expression von MalE-DctA <sub>362-428</sub> -T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

### DctA-Punktmutanten

pMW1257	Expression von DctA <sub>L414A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1258	Expression von DctA <sub>N415A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1259	Expression von DctA <sub>N416A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1260	Expression von DctA <sub>R417A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1261	Expression von DctA <sub>A418S</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1262	Expression von DctA <sub>P419A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1263	Expression von DctA <sub>D420A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1264	Expression von DctA <sub>L414A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1265	Expression von DctA <sub>N415A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1266	Expression von DctA <sub>N416A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1267	Expression von DctA <sub>R417A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1268	Expression von DctA <sub>A418S</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1269	Expression von DctA <sub>P419A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1270	Expression von DctA <sub>D420A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1344	Expression von DctA <sub>E404A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1345	Expression von DctA <sub>L405A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1346	Expression von DctA <sub>D406A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1347	Expression von DctA <sub>L410A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

pMW1347-2	Expression von DctA <sub>E404A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1348	Expression von DctA <sub>L405A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1349	Expression von DctA <sub>D406A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1350	Expression von DctA <sub>L410A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1457	Expression von DctA <sub>D411A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1458	Expression von DctA <sub>D412A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1459	Expression von DctA <sub>V413A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1460	Expression von DctA <sub>L414S</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1461	Expression von DctA <sub>L414I</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1462	Expression von DctA <sub>T305A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1463	Expression von DctA <sub>G92A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1464	Expression von DctA <sub>D411A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1465	Expression von DctA <sub>D412A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1466	Expression von DctA <sub>V413A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1467	Expression von DctA <sub>L414S</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1468	Expression von DctA <sub>L414I</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1469	Expression von DctA <sub>T305A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1470	Expression von DctA <sub>G92A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1478	Expression von T25-DctA <sub>D406A</sub> , pMW856-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1479	Expression von T25-DctA <sub>L414A</sub> , pMW856-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1480	Expression von T18-DctA <sub>D406A</sub> , pMW917-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1481	Expression von T18-DctA <sub>L414A</sub> , pMW917-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1524	Expression von DctA <sub>W401A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1525	Expression von DctA <sub>V402A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1527	Expression von DctA <sub>K409A</sub> -T25, pMW858-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

pMW1528	Expression von DctA <sub>W401A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1529	Expression von DctA <sub>V402A</sub> -T18, pMW918-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

**Verkürzte DctA-Punktmutanten**

pMW1642	Expression von DctA <sub>362-428-L414A</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1644	Expression von DctA <sub>362-428-L414A</sub> -T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1649	Expression von MalE-DctA <sub>362-428-L414A</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1650	Expression von MalE-DctA <sub>362-428-L414A</sub> -T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

**DcuS-Plasmide**

---

**Vollängen-DcuS**

pMW426	Expression von T25-DcuS, pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Scheu et al., 2011
pMW428	Expression von DcuS-T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Kleefeld, 2006
pMW429	Expression von T18-DcuS, pUT18C-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Scheu et al., 2011
pMW919	Expression von DcuS-T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

**Verkürztes DcuS**

pMW948	Expression von DcuS-TM2-T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW950	Expression von DcuS-PAS <sub>C</sub> -T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW952	Expression von PAS <sub>C</sub> -T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW954	Expression von Kinase-T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1076	Expression von PAS <sub>C</sub> -Kinase-T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011

**DcuS-Punktmutanten**

pMW1011	Expression von T25-DcuS <sub>N248D</sub> , pMW426-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1012	Expression von T18-DcuS <sub>N248D</sub> , pMW429-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1013	Expression von T25-DcuS <sub>N304D</sub> , pMW426-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1014	Expression von T18-DcuS <sub>N304D</sub> , pMW429-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1015	Expression von T25-DcuS <sub>V276A</sub> , pMW426-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011

pMW1016	Expression von T18-DcuS <sub>V276A</sub> , pMW429-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1017	Expression von T25-DcuS <sub>F221A</sub> , pMW426-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1018	Expression von T18-DcuS <sub>F221A</sub> , pMW429-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1056	Expression von DcuS <sub>N248D</sub> -T18, pMW428-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1057	Expression von DcuS <sub>N304D</sub> -T18, pMW428-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1058	Expression von DcuS <sub>V276A</sub> -T18, pMW428-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1059	Expression von DcuS <sub>F221A</sub> -T18, pMW428-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011

### Verkürzte DcuS-Punktmutanten

pMW978	Expression von DcuS-TM2 <sub>R107A</sub> -T18, pMW948-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW980	Expression von DcuS-TM2 <sub>H110A</sub> -T18, pMW948-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW982	Expression von DcuS-TM2 <sub>F120A</sub> -T18, pMW948-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW992	Expression von DcuS-PAS <sub>C-N248D</sub> -T18, pMW950-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW994	Expression von DcuS-PAS <sub>C-N304D</sub> -T18, pMW950-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW996	Expression von DcuS-PAS <sub>C-V276A</sub> -T18, pMW950-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW998	Expression von DcuS-PAS <sub>C-F221A</sub> -T18, pMW950-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Degreif-Dünnwald, 2011
pMW1400	Expression von DcuS-TM2 <sub>K55A</sub> -T18, pMW948-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Monzel, 2011

### DcuB-Plasmide

---

pMW425	Expression von T25-DcuB, pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Kleefeld, 2006
pMW857	Expression von T25-DcuB <sub>20-446</sub> , pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1027	Expression von DcuB <sub>1-211</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1028	Expression von DcuB <sub>1-211</sub> -T25 <sub>-213-446</sub> , pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1077	Expression von DcuB <sub>1-256</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1078	Expression von DcuB <sub>1-295</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1079	Expression von DcuB <sub>1-373</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1080	Expression von DcuB <sub>1-412</sub> -T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

**DcuR-Plasmide**

pMW427	Expression von T25-DcuR, pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Scheu et al., 2011
pMW431	Expression von T18-DcuR, pUT18C-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Kleefeld, 2006

**MalE-Plasmide**

pMW1645	Expression von MalE-T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1646	Expression von MalE-T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

**Tsr-Plasmide**

pMW1443	Expression von Tsr-T25, pKNT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1444	Expression von T25-Tsr, pKT25-Derivat, <i>kan<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1445	Expression von T18-Tsr, pUT18C-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1446	Expression von Tsr-T18, pUT18-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

Tab. 6: **Plasmide für die Fluoreszenzmikroskopie.** Das exprimierte Protein ist angegeben.

Stamm	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW526	Expression von DctA-YFP, pBAD30-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Bauer, 2010
pMW1338	Expression von DctA <sub>L414A</sub> -YFP, pMW526-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1339	Expression von DctA <sub>N415A</sub> -YFP, pMW526-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1340	Expression von DctA <sub>N416A</sub> -YFP, pMW526-Derivat, <i>amp<sup>r</sup></i>	Diese Arbeit

Tab. 7: **Mutageneseprimer (MWG Biotech, HPSF-gereinigt).** Die im Vergleich zur Ursprungssequenz geänderten Basen sind fett markiert und das Codon ist unterstrichen.

Name	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Mutation
<b>DctA-Mutagenese</b>			
DctA-C55S-for	CTC CTG TCA TCT TTT <u>CTA</u> CCG TCG TAA CGG	68,1	C55S
DctA-C55S-rev	CCG TTA CGA CGG <u>TAG</u> AAA AGA TGA CAG GAG	68,1	C55S
DctA-G92A-f	GCG CTG ATT ATT <u>GCT</u> CTT ATC ATC GTT AAC	64	G92A
DctA-G92A-r	GTT AAC GAT GAT AAG <u>AGC</u> AAT AAT CAG CGC	64	G92A
DctA-C225S_f	GGC AGC TGA TTA TCT <u>CTT</u> TCT ACA TTA CC	63,9	C225S
DctA-C225_r	GGT AAT GTA GAA <u>AGA</u> GAT AAT CAG CTG CC	63,9	C225S
DctA-230_f	TTC TAC ATT ACC <u>TCT</u> ATC CTG TTT GTG GTG	64	C230S
DctA-230_r	CAC CAC AAA CAG GAT <u>AGA</u> GGT AAT GTA GAA	64	C230S
DctA-C285S-for	GGA GAA ACT CGG <u>CTC</u> CCG TAA ATC GGT GG	70,9	C285S

DctA-C285S-rev	CCA CCG ATT TAC <u>GGG</u> AGC CGA GTT TCT CC	70,9	C285S
DctA-T305A-f	CCT TGA TGG <u>CGC</u> ATC GAT ATA CCT GAC AAT G	68,2	T305A
DctA-T305A-r	CAT TGT CAG GTA TAT CGA <u>TGC</u> GCC ATC AAG G	68,2	T305A
DctA-W401A-f	TTG TCG TTG CTA <u>AGG</u> <u>CGG</u> TGA AAG AAC TGG	68,1	W401A
DctA-W401A-r	CCA GTT CTT TCA <u>CCG</u> <u>CCT</u> TAG CAA CGA CAA	68,1	W401A
DctA-V402A-f	GTT GCT AAG TGG <u>GCG</u> AAA GAA CTG GAC CAC	69,5	V402A
DctA-V402A-r	GTG GTC CAG TTC TTT <u>CGC</u> CCA CTT AGC AAC	69,5	V402A
DctA-E404A-f	CTA AGT GGG TGA AAG <u>CAC</u> TGG ACC ACA AAA	66,8	E404A
DctA-E404A-r	TTT TGT GGT CCA <u>GTG</u> <u>CTT</u> TCA CCC ACT TAG	66,8	E404A
DctA- L405A-f	GTG GGT GAA AGA <u>AGC</u> <u>GGA</u> CCA CAA AAA ACT	66,8	L405A
DctA- L405A-r	AGT TTT TTG TGG <u>TCC</u> <u>GCT</u> TCT TTC ACC CAC	66,8	L405A
DctA- D406A-f	GTG AAA GAA CTG <u>GCC</u> CAC AAA AAA CTG GAC	66,8	D406A
DctA- D406A-r	GTC CAG TTT TTT GTG <u>GGC</u> CAG TTC TTT CAC	66,8	D406A
DctA-K409A-f	GAA CTG GAC CAC AAA <u>GCA</u> CTG GAC GAT GTG	69,5	K409A
DctA-K409A-r	CAC ATC GTC CAG <u>TGC</u> TTT GTG GTC CAG TTC	69,5	K409A
DctA- L410A-f	TGG ACC ACA AAA AAG <u>CGG</u> ACG ATG TGC TGA	68,1	L410A
DctA- L410A-r	TCA GCA CAT CGT <u>CCG</u> <u>CTT</u> TTT TGT GGT CCA	68,1	L410A
DctA-D411A-f	CAC AAA AAA CTG <u>GCC</u> GAT GTG CTG AAT AAT C	65,5	D411A
DctA-D411A-r	GAT TAT TCA GCA CAT <u>CGG</u> <u>CCA</u> GTT TTT TGT G	65,5	D411A
DctA-D412A-f	CAC AAA AAA CTG GAC <u>GCT</u> GTG CTG AAT AAT C	65,5	D412A
DctA-D412A-r	GAT TAT TCA GCA <u>CAG</u> <u>CGT</u> CCA GTT TTT TGT G	65,5	D412A
DctA-V413A-f	AAC TGG ACG ATG <u>CGC</u> TGA ATA ATC GTG CGC	69,5	V413A
DctA-V413A-r	GCG CAC GAT TAT TCA <u>GCG</u> CAT CGT CCA GTT	69,5	V413A
DctA-L414A-f	CTG GAC GAT GTG <u>GCG</u> AAT AAT CGT GCG CCG	72,2	L414A
DctA-L414A-r	CGG CGC ACG ATT ATT <u>CGC</u> CAC ATC GTC CAG	72,2	L414A
DctA-L414I-f	ACT GGA CGA TGT <u>GAT</u> <u>TAA</u> TAA TCG TGC GCC G	68,2	L414I
DctA-L414I-r	CGG CGC ACG ATT ATT <u>AAT</u> CAC ATC GTC CAG T	68,2	L414I
DctA-L414S-f	ACT GGA CGA TGT <u>GAG</u> <u>CAA</u> TAA TCG TGC GCC	69,5	L414S
DctA-L414S-r	GGC GCA CGA TTA <u>TTG</u> <u>CTC</u> ACA TCG TCC AGT	69,5	L414S
DctA- N415A-f	GAC GAT GTG CTG <u>GCT</u> AAT CGT GCG CCG GAT G	73,5	N415A
DctA- N415A-r	CAT CCG GCG CAC GAT <u>TAG</u> <u>CCA</u> GCA CAT CGT C	73,5	N415A
DctA- N416A-f	CGA TGT GCT GAA <u>TGC</u> <u>TCG</u> TGC GCC GGA TGG	73,6	N416A
DctA- N416A-r	CCA TCC GGC GCA CGA <u>GCA</u> TTC AGC ACA TCG	73,6	N416A
DctA- R417A-f	GAT GTG CTG AAT AAT <u>GCT</u> GCG CCG GAT GGC	70,9	R417A
DctA- R417A-r	GCC ATC CGG CGC <u>AGC</u> ATT ATT CAG CAC ATC	70,9	R417A
DctA- A418S-f	CTG AAT AAT CGT <u>AGT</u> CCG GAT GGC AAA ACG	66,8	A418S
DctA- A418S-r	CGT TTT GCC ATC CGG <u>ACT</u> ACG ATT ATT CAG	66,8	A418S
DctA- P419A-f	GAA TAA TCG TGC <u>GGC</u> GGA TGG CAA AAC GCA	69,5	P419A
DctA- P419A-r	TGC GTT TTG CCA <u>TCC</u> <u>GCC</u> GCA CGA TTA TTC	69,5	P419A
DctA- D420A-f	ATC GTG CGC CGG <u>CTG</u> GCA AAA CGC ACG AA	72,3	D420A
DctA- D420A-r	TTC GTG CGT TTT GCC <u>AGC</u> CGG CGC ACG AT	72,3	D420A

### DcuB-Mutagenese

dcuB1-211-mut_f	GCT GCA CCA TCG ATA <u>GTA TAC CTC GAG</u> TAA TAT GGT G	70,6	+ <i>Bst</i> 1107 + <i>Xho</i> 1
dcuB1-211-mut_r	CAC CAT ATT <u>ACT CGA GGT ATA CTA</u> TCG ATG GTG CAG C	70,6	+ <i>Bst</i> 1107 + <i>Xho</i> 1

Tab. 8: **Primer für die Konstruktion von Expressionsplasmiden (MWG Biotech, HPSF-gereinigt).** Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Name	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Schnittstelle
dctA-BamHI-for	CTA AAG <u>GAT CCC</u> CTA TGA AAA CC	58,9	<i>Bam</i> HI
dctA-XhoI-rev	GTG GTG <u>CTC GAG</u> ATA AGA GG	59,3	<i>Xho</i> I
dctA-his-pBAD_f	CCC <u>CTC TAG ACA</u> ATA ATT TTG	54	<i>Xba</i> I
dctA-his-pBAD_r	GTT AGA <u>AGC TTG</u> ATC TCA GT	53,2	<i>Hind</i> III
DcuS-pBAD-XbaI-f	CAA TTC CCC <u>TCT AGA</u> AAT AAT	52	<i>Xba</i> I
DcuS-pBAD-Hind3-r	CCG <u>CAA GCT TGA</u> TCA TCT	53,7	<i>Hind</i> III

Tab. 9: **Primer für die Konstruktion von Plasmiden für die Topologiebestimmung (MWG Biotech, HPSF-gereinigt).** Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Name	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Schnittstelle
lacpho2-PstI-for	CGT CAC <u>GGC TGC AGG</u> AAA GCG	65,7	<i>Pst</i> I
lacZ2-rev	CTC ATG TTT GAC AGC TTA TCA TCG	59,3	keine
dctA1-pBAD_f2	CCA CTC CCT ATC AGT GAT AGA G	60,3	keine
dctA-028-pBAD_r	GCT CGC <u>CGT CGA CAG</u> GAT A	61	<i>Sal</i> I
dctA-065-pBAD_r	GCC TTC <u>GTC GAC</u> TTC CAT G	58,8	<i>Sal</i> I
dctA-105-pBAD_r	CCG GAT <u>CGT CGA CCA</u> TTC	58,2	<i>Sal</i> I
dctA-131-pBAD_r	CAT CCA <u>TGT CGA CGG</u> CGA CA	61,4	<i>Sal</i> I
dctA-150-pBAD_r	GCA GCA <u>CGT CGA CAA</u> TGT TAC	59,8	<i>Sal</i> I
dctA-170-pBAD_r	ATC AGG <u>TCG ACT</u> TTG CTG C	56,7	<i>Sal</i> I
dctA-180-pBAD_r	ATG ACC <u>TGG TCG ACA</u> CTT TCG	59,8	<i>Sal</i> I
dctA-200-pBAD_r	CAT TGC <u>GTC GAC</u> CGC ACC	60,5	<i>Sal</i> I
dctA-208-pBAD_r	ACG CCG <u>TAG TCG ACG</u> ATG GT	61,4	<i>Sal</i> I
dctA-215-pBAD_r	CCA GTT <u>GTC GAC</u> CAG TGT G	58,8	<i>Sal</i> I
dctA-242-pBAD_r	AAC CAG <u>TGT CGA CAG</u> CGA TTG	59,8	<i>Sal</i> I
dctA-250-pBAD_r	AGC GGG <u>TCG ACG</u> AAG ATA C	58,8	<i>Sal</i> I
dctA-270-pBAD_r	CAG <u>GTC GAC</u> CTC GGA AGA TG	61,4	<i>Sal</i> I
dctA-290-pBAD_r	GGG ATG <u>ACG TCG ACC</u> ACC A	61	<i>Sal</i> I
dctA-300-pBAD_r	GCC ATC <u>GTC GAC</u> AAA CGA G	58,8	<i>Sal</i> I
dctA-310-pBAD_r	GCG <u>TCG ACT</u> GTC AGG TAT ATC	59,8	<i>Sal</i> I
dctA-323-pBAD_r	CGA TAG <u>TCG ACC</u> TGA CTG TT	57,3	<i>Sal</i> I
dctA-340-pBAD_r	TGC CGC <u>GTC GAC</u> AGA AGA AAG	61,8	<i>Sal</i> I
dctA-350-pBAD_r	CAG <u>GTC GAC</u> AAA GCC ACT A	56,7	<i>Sal</i> I
dctA-365-pBAD_r	GAC <u>CGT CGA CCG</u> GCA AAT G	61	<i>Sal</i> I
dctA-373-pBAD_r	GCG GTC <u>GTC GAC</u> GAG GAT C	63,1	<i>Sal</i> I
dctA-380-pBAD_r	CGA <u>GTC GAC</u> TGA CAT AAA GC	57,3	<i>Sal</i> I
dctA-390-pBAD_r	GGT CGC TAC <u>GTC GAC</u> ACC G	63,1	<i>Sal</i> I
dctA-403-pBAD_r	GTG GTC <u>GTC GAC</u> TTT CAC C	58,8	<i>Sal</i> I

Tab. 10: **Primer für die Konstruktion von Plasmiden des BACTH-Systems (MWG Biotech, HPSF-gereinigt).** Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Name	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Schnittstelle
<b>CitA</b>			
pUT18C-citA-f	CGC AAG <u>GTC TAG ACA</u> TGT TGC AGC	64,4	<i>Xba</i> I
citA-pUT18-r	TCG TCC <u>TGA ATT CCG</u> ATC AAT AGG G	63	<i>Eco</i> RI
<b>CitB</b>			
pKT25-citB-f2	GAA AGT <u>GGA TCC</u> AAT GAC AGC TCC	62,7	<i>Bam</i> HI
citB-pKNT25-r	GGC TTT <u>AGA ATT CCA</u> CCC ACT G	60,3	<i>Eco</i> RI
pKT25-citB-r2	CTC CGG <u>AAT TCT</u> CAT GTC ACC CAC	64,4	<i>Eco</i> RI
<b>DctA</b>			
pKT25-dctA_B_for	CTA AAG <u>GAT CCC</u> CTA TGA AAA C	56,5	<i>Bam</i> HI
dctA-pKNT_E_rev	CAT AAG TGA TGG <u>AAT TCA</u> GAG G	56,5	<i>Eco</i> RI
pKT25-dctA_E_rev	GGG CAG <u>AAT TCA</u> TGA GAT TAA G	56,5	<i>Eco</i> RI
<b>Verkürztes DctA</b>			
pKNT25-seq_for	CAC ACA GGA AAC AG CTAT GAC	57,9	keine
dctA-215-NT25_r	CCC CAG TTG <u>AAT TCA</u> GTG TGC	59,8	<i>Eco</i> RI
dctA-250-NT25_r	GCG GAT <u>GAA TTC</u> CGG AAG ATA C	60,3	<i>Eco</i> RI
dctA-323-NT25_r	TGG ACG ATA TCG <u>AAT TCT</u> GAC TG	58,9	<i>Eco</i> RI
dctA-350-NT25_r	CAG CAC <u>GAA TTC</u> AAG CCA CTA C	60,3	<i>Eco</i> RI
dctA-380-NT25_r	CGC ACG AGA <u>ATT CGA</u> CAT AAA G	58,4	<i>Eco</i> RI
dctA1-403-NT25_r	GTG GTC <u>GAA TTC</u> TTC ACC CAC T	60,3	<i>Eco</i> RI
dctA1-413-NT25_r	CGA TTA <u>GAA TTC</u> ACA TCG TCC AG	58,9	<i>Eco</i> RI
dctA1-415-NT25_r	TCC GGC <u>GAA TTC</u> TTA TTC AGC	57,9	<i>Eco</i> RI
dctA1-420-NT25r	GTT <u>GAA TTC</u> TCC GGC GCA CG	61,4	<i>Eco</i> RI
KT25-dctA36-_f	GCA AAT <u>GGA TCC</u> GCT TGG CG	61,4	<i>Bam</i> HI
KT25-dctA73-_f	GG TCG <u>GAT CCT</u> ACC GGC	60	<i>Bam</i> HI
KT25-dctA124-_f	GTT TAC GCG <u>GAT CCG</u> GCG AA	61,4	<i>Bam</i> HI
KT25-dctA168-_f	TCC ACG <u>GAT CCG</u> GGC AG	60	<i>Bam</i> HI
KT25-dctA-428_r	AAC GAC GGC CGA <u>ATT CAT</u> GAG A	60,3	<i>Eco</i> RI
dctA364-NT25_f	GCG GTG <u>GAT CCT</u> TTG CCG G	63,6	<i>Bam</i> HI
dctA400-NT25_f	CAT TGT <u>GGA TCC</u> TAA GTG GG	57,3	<i>Bam</i> HI
pKNT25-seq_rev	GTC GGC GGC GTT TGC GTA	60,5	keine
<b>DcuB</b>			
pKT-dcuB20_P_for	CAG AAA <u>GGC TGC AGT</u> CGC G	61	<i>Pst</i> I
pKT-dcuB20_E_rev	GCG GCA CGG <u>AAT TCG</u> CAT T	58,8	<i>Eco</i> RI
dcuB-NT25_f	CGG <u>GCT GCA GCA</u> TGT TAT TTA C	60,3	<i>Pst</i> I
dcuB-211-NT25_r	CGG TTT TCC <u>GGA TCC</u> GAG ATG	61,8	<i>Bam</i> HI
HindIII_dcuB-fo	GAC CGC <u>GGA AGC TTG</u> TTC ACT ATC CAA C	68	<i>Hind</i> III
dcuB256-rev	GGA CGC <u>GGA TCC</u> GAA TCA GC	63,5	<i>Bam</i> HI
dcuB295-rev	GAA GAC TTC <u>GGG ATC CGA</u> GAT AGA ACG	66,4	<i>Bam</i> HI
dcuB373-rev	GTA TGC <u>CGG ATC CAC</u> GCC GAT CG	67,8	<i>Bam</i> HI
dcuB412-rev	GAC GAA <u>GGG ATC CAT</u> GTG GGT G	64	<i>Bam</i> HI



dcuB-NT25_f	CGG <u>GCT GCA GCA</u> TGT TAT TTA C	60,3	<i>PstI</i>
dcuB-211-NT25_r	CGG TTT TCC <u>GGA TCC</u> GAG ATG	61,8	<i>BamHI</i>
dcuB213-446_Bs-for	CAT CTC <u>CGT ATA CGA</u> AAA CCG TG	60,6	<i>Bst1107I</i>
dcuB213-446_X-rev	CGG CCG AAT <u>TCT CGA</u> GTT ATA AG	60,6	<i>XhoI</i>

**MalE**

malE-NT25_f	CAA GGA CCA <u>AAG CTT</u> GAT GAA AAT	60,3	<i>HindIII</i>
malE-NT25_r	GCA TTT CAC <u>TGC AGT</u> ACT TGG T	60,1	<i>PstI</i>

**Tsr**

BACTH-tsr_f	CAG GAA AGA <u>GGA TCC</u> CAT GTT A	58,4	<i>BamHI</i>
pKT25-tsr_r	CTT ATC GGG <u>CGA ATT</u> CAT GGC	59,8	<i>EcoRI</i>
pKNT25-tsr_r	CAT GGC <u>GAA TTC</u> AAT GTT TCC CA	58,9	<i>EcoRI</i>

Tab. 11: Primer für die Transkriptionsanalyse von *yfcC* (MWG Biotech, HPSF-gereinigt).

Name	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)
ackA_for_RT	GCC CTG CCT TAC AAC CTG TAC	61,8
ackA_rev_RT	CAG GCA GTC AGG CGG CTC	62,8
pta_for_RT	GCG TCT CAG GGT GTA GAA CTG	61,8
pta_rev_RT	CTG CTG CTG TGC AGA CTG AAT C	62,2
yfcC_for_RT	GGC AAT GCC CGA TAC GTT GG	61,4
yfcC_rev_RT	CCC CTG AGC AAC GAC CAC A	61

Tab. 12: Sequenzierungsprimer (MWG Biotech, HPSF-gereinigt).

Name	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)
phoA-seq-rev	GCG GCG AGC ACC GCC GGG TGC	73,5
pKNT25-seq_for	CAC ACA GGA AAC AG CTAT GAC	57,9
pKNT25-seq_rev	GTC GGC GGC GTT TGC GTA	60,5
pKT25-seq_for2	GCG ATT CGG TGA CCG ATT AC	59,3
pKT25-seq_rev	GGA TGT GCT GCA AGG CGA TT	59,3
pUT18-Seq-for	CCA AGC TTG CAT GCC TGC	58,2
pUT18-Seq-rev	CG ACG CGC CTC GGT GCC CAC	69,9
pUT18C-for-seq	CTG GAA ACG GTG CCG GCG TC	65,5
pUT18C-rev-seq	CGG GGC TGG CTT AAC TAT GC	61,4
atoE_P1-for2	GTG GCT CAC CGA AAT TGC CG	61,4
atoE_P1-rev2	TGG TGG AAG CGA GTG AAC CG	61,4
actP_P1-for	CGA ACG GCG AAT TCG ACC GT	61,4
actP_P1-rev	TTG GGA GAG GAA GAG TAT TCC CC	62,4
yfcC_P1-for	GCG CCA TCC CAC TTT GCA TAC	61,8
yfcC_P1-rev2	CTG AAA GCG CTA GCG TTG TGG	61,8
Kan_P1-for	CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC	61,4
Kan_P1-rev	CCA GTC ATA GCC GAA TAG CCT C	62,1

## 3.2 Zucht und Medien

### 3.2.1 Zucht von *Escherichia coli*

Bei allen Arbeiten wurden, soweit möglich, Antibiotika in der angegebenen Konzentration verwendet (vgl. S. 33). Bei dem Einsatz von mehreren Antibiotika wurde deren Konzentration halbiert. Gegebenenfalls erfolgte eine Induktion der Plasmide wie beschrieben.

#### Genetische Arbeiten

Für alle genetischen Arbeiten wurden Kulturen von *Escherichia coli* aerob in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C gezüchtet (Excella E24, New Brunswick Scientific).

#### Expression und *in vivo* Cross-Linking von DctA

Vorkulturen von *Escherichia coli* wurden aerob in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 30°C oder 37°C gezüchtet (Excella E24, New Brunswick Scientific). Die Hauptkulturen (5 ml LB) wurden mit 2 % Inokulum aus den Vorkulturen beimpft und bei einer  $OD_{578nm} = 0,5-0,7$  wie beschrieben mit L-Arabinose, IPTG oder AHT induziert und nach einer, drei oder fünf Stunden weiteren Wachstums bei 30°C geerntet.

#### Saccharosedichtegradientenultrazentrifugation

Vorkulturen wurden aerob in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C gezüchtet (Excella E24, New Brunswick Scientific). Die Hauptkulturen (100 ml LB, Erlenmeyer-Kolben) wurden mit 2 % Inokulum aus den Vorkulturen beimpft, bis zu einer  $OD_{578nm} = 0,5-0,7$  gezüchtet, dann mit 0,01 % L-Arabinose (= 670  $\mu$ M) induziert und bei 30°C für drei weitere Stunden gezüchtet.

#### *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie

Vorkulturen von *Escherichia coli* wurden aerob in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 30°C gezüchtet (Excella E24, New Brunswick Scientific). Die Hauptkulturen (5 ml LB) wurden mit 1 % Inokulum aus den Vorkulturen beimpft, direkt mit L-Arabinose oder IPTG induziert und bei 30°C bis zu einer  $OD_{578nm} = 0,5-0,7$  gezüchtet.

#### Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System

Plasmide zur Untersuchung einer Protein-Protein-Interaktion mit dem BACTH-System wurden in *Escherichia coli* BTH101 co-transformiert, ausplattiert und wuchsen für 40 Stunden bei 30°C auf LB-Platten mit IPTG und Antibiotika. Vorkulturen wurden aerob in 5 ml LB-Medium mit 500  $\mu$ M IPTG induziert und über Nacht bei 30°C gezüchtet

(Certomat IS, B. Braun Biotech International). Die Hauptkulturen (5 ml LB) wurden mit 4 % Inokulum beimpft, mit 500  $\mu\text{M}$  IPTG induziert und bis zu einer  $\text{OD}_{578\text{nm}} = 0,5-0,7$  bei 30°C gezüchtet. Für die Messungen bezüglich der Fumaratabhängigkeit wurde *Escherichia coli* BTH101 in eM9-Medium mit Glycerin oder Fumarat als Kohlenstoffquelle gezüchtet. Vorkulturen wurden aerob in 5 ml eM9-Medium mit 500  $\mu\text{M}$  IPTG induziert und für 48 Stunden bei 30°C gezüchtet. Die Hauptkulturen (5 ml) wurden mit 10 % Inokulum beimpft, mit 500  $\mu\text{M}$  IPTG induziert und bis zu einer  $\text{OD}_{578\text{nm}} = 0,5-0,7$  bei 30°C gezüchtet.

### Reportergenaktivität ( $\beta$ -Galaktosidaseaktivität)

Zuchten für die Messung aerober Reportergenaktivitäten erfolgten in eM9-Medium mit Glycerin, Fumarat oder Glycerin plus Fumarat (jeweils 50 mM) als Kohlenstoffquelle. Die Hauptkulturen wurden 5 % aus 5 ml über Nacht bei 37°C gezüchteten Vorkulturen angeimpft und für 15 Stunden bis in die frühe stationäre Phase aerob bei 37°C gezüchtet. Für die Messung anaerob exprimierter Reportergene wurden semi-anaerobe 5 ml Standkulturen in eM9-Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle mit oder ohne Fumarat plus DMSO als zusätzlichen Elektronenakzeptoren (jeweils 50 mM) bei 37°C für mindestens 24 Stunden inkubiert. Die anaeroben Hauptkulturen wurden in gasdichten Sovirellröhrchen mit 2-8 % Vorkultur beimpft. Anschließend wurden die Kulturen drei mal 15 Minuten entgast und die Luft durch Stickstoff ersetzt (1,2 atm; Reinheit >99,999 %, Westfalengas). Die so anaerobisierten Kulturen wurden bis zu einer  $\text{OD}_{578\text{nm}} = 0,5-0,7$  gezüchtet.

### Topologiebestimmung durch LacZ- und PhoA-Fusionen

Vorkulturen von *Escherichia coli* wurden aerob in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C gezüchtet (Excella E24, New Brunswick Scientific). Die Hauptkulturen (5 ml LB) wurden mit 2 % Inokulum beimpft, bis zu einer  $\text{OD}_{578\text{nm}} = 0,5-0,7$  gezüchtet, dann mit 0,2 % L-Arabinose (= 13,3 mM) induziert und bei 30°C für drei weitere Stunden gezüchtet.

### Transport von [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetat und Transkription von *yfcC*

Die Zucht erfolgte aerob in eM9-Medium mit Acetat (50 mM) als Kohlenstoffquelle. Die Hauptkulturen wurden 2 % aus 5 ml über Nacht bei 37°C gezüchteten Vorkulturen angeimpft und für bis zu einer  $\text{OD}_{578\text{nm}} = 0,5-0,7$  gezüchtet.

### Wachstumsexperimente

Aerobe Wachstumsexperimente erfolgten in eM9-Medium, entweder mit Glukose, Acetat, Succinat, Fumarat oder Glycerin (jeweils 50 mM) als einziger Kohlenstoffquelle. Die Hauptkulturen (10-50 ml) wurden 2-4 % aus 5 ml über Nacht bei 37°C gezüchteten Vorkulturen angeimpft, für mindestens 8 Stunden gezüchtet und die OD<sub>578nm</sub> stündlich gemessen. Für anaerobe Wachstumsexperimente wurden semi-anaerobe 5 ml Standkulturen in eM9-Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle mit Fumarat als zusätzlichem Elektronenakzeptor (jeweils 50 mM) bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Die anaeroben Hauptkulturen (10-50 ml) wurden in gasdichten Sovirellröhrchen oder Müller-Krempel-Flaschen mit 2-8 % Vorkultur beimpft. Anschließend wurden die Kulturen drei mal 15 Minuten entgast und die Luft durch Stickstoff ersetzt (1,2 atm; Reinheit >99,999 %, Westfalengas). Die OD<sub>578nm</sub> der so anaerobisierten Kulturen wurde in definierten Zeitabständen gemessen.

### Export von MalE-Fusionen

MalE wird mittels einer N-terminalen Signalsequenz in das Periplasma exportiert. Zur Überprüfung des funktionalen Exports von MalE-Fusionsproteinen wurde der *malE*-deletierte Stamm NT326 mit den MalE-Fusionsplasmiden transformiert und auf eM9-Agarplatten mit 0,4 % Maltose als einziger Kohlenstoffquelle ausgestrichen. Die Zucht erfolgte für zwei bis drei Tage bei 37°C.

### 3.2.2 Medien und Puffer

Alle Medien und Puffer wurden vor Gebrauch autoklaviert oder sterilfiltriert.

#### LB-Medium (Sambrook und Russell, 2001)

10 g/l Casein

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

#### LB-Agar

LB-Medium mit 15 g/l Agar-Agar

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

LB-Agar mit:

50 µg/ml Kanamycin

100 µg/ml Ampicillin

500 µM IPTG

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

R-Agar

10 g/l Bacto-Trypton

8 g/l NaCl

1 g/l Hefeextrakt

1 g/l Glukose

12 g/l Agar-Agar

Nach dem autoklavieren steril hinzugeben:

2 mM CaCl<sub>2</sub>

R-Top-Agar

LB-Medium plus 6,5 g/l Agar-Agar

Direkt vor Verwendung steril hinzugeben:

5 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM MgSO<sub>4</sub>

Maltose-Agar

H<sub>2</sub>O plus 6,5 g/l Agar-Agar

Nach dem Autoklavieren steril hinzugeben:

Komponenten für eM9-Medium

0,4 % (w/v) Maltose

MC-Puffer

10 mM MgSO<sub>4</sub>

5 mM CaCl<sub>2</sub>

eM9-Minimal-Medium (Miller, 1992)

10 x M9 Stammlösung (pH 7,0)

60 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

30 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5 g/l NaCl

10 g/l NH<sub>4</sub>Cl

Zusätze (separat autoklaviert)

10 ml/l CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 10 mM

10 ml/l säurehydrolysiertes Casein, 10 %

5 ml/l L-Tryptophan, 1 %

1 ml/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 1 M

Kohlenstoffquellen, Elektronenakzeptoren und Effektoren (Endkonzentration)

50 mM DMSO

50 mM Glukose

50 mM Glycerin

50 mM Na-Acetat

50 mM Na<sub>2</sub>-Fumarat

50 mM Na<sub>2</sub>-Succinat

Falls erforderlich, wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

SOC-Medium, Erholungsmedium nach Transformation (Sambrook und Russell, 2001)

20 g/l Casein

5 g/l Hefeextrakt

0,584 g/l NaCl

0,19 g/l KCl

2,46 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

2,03 g/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

3,96 g/l Glukose x H<sub>2</sub>O

Glycerin-MOPS

1 mM MOPS

15 % Glycerin

Induktoren (Stammlösungen)

- 1 M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)
- 1 M L(+)-Arabinose
- 1 M Anhydrotetracyclin (AHT)

PBS-Puffer, pH 7,5 (10 x)

- 1,37 M NaCl
- 0,027 M KCl
- 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

<b>Antibiotika</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 $\mu$ g/ml
Kanamycinsulfat	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 $\mu$ g/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 $\mu$ g/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml in Ethanol	20 $\mu$ g/ml
Tetracyclin	15 mg/ml in H <sub>2</sub> O	15 $\mu$ g/ml

Puffer und Lösungen für  $\beta$ -Galaktosidase Tests (Miller, 1992) $\beta$ -Galaktosidase Reaktionspuffer, pH 7

- 100 mM Kaliumphosphat-Puffer
- 10 mM KCl
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2,7 ml/l 2-Mercaptoethanol

Lösungen für den  $\beta$ -Galaktosidase Test

- 4 mg/ml o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG)
- 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- Chloroform
- 0,1 % SDS

## Puffer und Lösungen für alkalische Phosphatase Tests (Calamia und Manoil, 1990)

### Phosphatase Puffer, pH 8

Puffer PI	10 mM Tris/HCl
	150 mM NaCl
Puffer PII	1 M Tris/HCl
	1 mM ZnCl <sub>2</sub>

### Lösungen für den Phosphatase Test

0,4 % (w/v) p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP), gelöst in Puffer PII
2,5 M HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Chloroform
0,1 % SDS

## Puffer und Lösungen für Transportmessungen mit [<sup>14</sup>C]-markierten Substraten

### Puffer TI, pH 7

100 mM Na/K-Phosphatpuffer, pH 7
1 mM MgSO <sub>4</sub>

### Lösungen

1 M Glukose
1-[ <sup>14</sup> C]-Acetat (Hartmann Analytic, 57 mCi/mmol)
2,3-[ <sup>14</sup> C]-Acetat (Hartmann Analytic, 44 mCi/mmol)
0,1 M LiCl
Szintillationslösung (Roth, Rotiszint ecoplus)

## Substrate für die kompetitive Hemmung der Acetat-Aufnahme

1 mM Butyrat
1 mM Laktat
1 mM Malat
1 mM Oxalat
1 mM Propionat



Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Trenngel (12 %)

8 ml Acrylamid-Mix 30 % Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid  
6,5 ml H<sub>2</sub>O  
5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8  
0,2 ml 10 % (w/v) SDS  
0,02 ml TEMED  
0,2 ml 10 % APS

Sammelgel (4 %)

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

Laufpuffer (10 x)

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

SDS-Probenpuffer (2 x)

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

SDS-Proteinfärbung

2 g/l Coomassie brilliant blue  
10 % (v/v) Eisessig  
5 % (v/v) Methanol

SDS-Entfärbung

10 % (v/v) Eisessig  
5 % (v/v) Methanol

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

### Transferpuffer

Anodenpuffer	0,3 M Tris/HCl, pH 10,4 20 % (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	0,04 M $\epsilon$ -Aminocapronsäure 0,025 M Tris/HCl, pH 9,4 20 % (v/v) Methanol

### Western Blot Proteinfärbung

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

## Immunfärbung

### Blockierungspuffer (BI)

10 % (w/v) Magermilchpulver
0,1 % (v/v) Tween 20
verdünnt in 1 x PBS

### Blockierungspuffer (BII)

3 % (w/v) BSA oder 5-10 % (w/v) Magermilchpulver
0,1 % (v/v) Tween 20
verdünnt in 1 x PBS

### Waschpuffer (BIII)

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

### Antikörperlösung

25 ml Blockierungspuffer (BII) plus Antikörper

### Primärantikörper

Penta-His-Antikörper, IgG1-Fraktion aus Maus (Qiagen)
Verdünnung 1:5000-1:10000
DctA-Antikörper, IgG-Fraktion aus Kaninchen (Genscript)
Verdünnung 1:2000-1:2500
Strep-Antikörper, HRP-Konjugat (IBA)
Verdünnung 1:100

PhoA-Antikörper, IgG1-Fraktion aus Maus (Sigma-Aldrich)

Verdünnung 1:10000

Sekundärantikörper

Anti-IgG gegen Maus, HRP-gekoppelt (Qiagen)

Verdünnung 1:5000-1:50000

Anti-IgG gegen Kaninchen, HRP-gekoppelt (Sigma-Aldrich)

Verdünnung 1:5000

Nachweisreaktionen

Chlornaphthol-Färbung

30 mg 4-Chlor-1-naphthol in 20 ml Ethanol

80 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7,6

50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %

Chemilumineszenz

Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)

*In vivo* Cross-Linking mit Disuccinimidyl Suberat (DSS)

Cross-Linker

25 mM DSS (Stammlösung)

Stopp-Lösung

1 M Tris/HCl, pH 7,6 (Stammlösung)

Puffer und Lösungen für den Saccharosedichtegradienten

50 % (w/v) Saccharose-Stammlösung

Puffer MI 500 mM NaCl

50 mM Tris/HCl, pH 7,7

1 mM EDTA

Puffer MII 50 mM Tris/HCl, pH 7,7

### 3.3 Molekulargenetische Methoden

Molekulargenetische Standardmethoden wie die PCR, Restriktion und Ligation von DNA wurden nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. Genomische DNA wurde mit dem Nucleospin C+T Kit (Macherey & Nagel) isoliert. Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden). Plasmide wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder dem Genejet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) isoliert. DNA-Konzentrationen wurden mit einem Biophotometer in Mikroliterküvetten bestimmt (Eppendorf). Die DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen (Fermentas) geschnitten, Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase restringiert (CIAP oder SAP, Fermentas) und mit Hilfe der T4 DNA-Ligase bei 16°C über Nacht ligiert. Ligationsansätze wurden gefällt oder direkt für die Transformation in elektrokompente Zellen (hergestellt nach Farinha et al., 1990) von *E. coli* durch Elektroporation (Dower et al., 1988) verwendet. Eine Co-Transformation von mehreren Plasmiden mit unterschiedlichen Resistenzen und Replikationsursprüngen (Novick, 1987) erfolgte ebenfalls durch Elektroporation.

Die gerichtete Mutagenese wurde mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) oder alternativ mit einer der Polymerasen *PfuUltra* (Stratagene) bzw. Phusion (Finnzymes) in Kombination mit *DpnI*-Endonuklease (Fermentas) und XL1-Blue hitzekompetenten Zellen (Stratagene) durchgeführt. Die Herstellung von hitzekompetenten Zellen erfolgte durch aerobe Zucht in LB-Medium bis zu einer  $OD_{578nm}$  von 0,5. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen geerntet und mehrfach mit eiskaltem TSB-Medium gewaschen. Die Zellen wurden pro ml Zucht in 10 µl TSB resuspendiert, auf 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Transformation erfolgte nach der Anleitung des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits.

Alle hergestellten Plasmide wurden durch Sequenzierung (Agowa LGC, Berlin; Genterprise, Mainz) in ihrer Sequenz bestätigt.

#### 3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (Mullis et al., 1986). Wenn möglich, wurden die DNA-Fragmente durch Polymerasen mit Korrekturlesefunktion (*PfuUltra*, *PfuTurbo*, Stratagene; Phusion, Finnzymes) vervielfältigt. Wurde kein Produkt erhalten, kam eine Taq-Polymerase (Abgene) zum Einsatz. Die Reaktionen wurden entweder im iCycler (Bio-Rad), MyCycler (Bio-Rad) oder MJ Mini Cycler (Bio-Rad) durchgeführt.

Tab. 13: Endkonzentrationen der verschiedenen Komponenten für einen PCR-Ansatz mit unterschiedlichen Polymerasen.

Komponenten	Phusion (Finnzymes)	<i>PfuUltra</i> (Stratagene)	<i>Taq</i> (Abgene)
PCR-Puffer	10 µl HF-Puffer	5 µl <i>PfuUltra</i> -Puffer	5 µl <i>Taq</i> -Puffer
dNTP Mix (10 mM)	jeweils 250 µM	jeweils 250 µM	jeweils 250 µM
MgCl <sub>2</sub>	im Puffer enthalten	im Puffer enthalten	1,5 - 3 mM
Primer	jeweils 0,5 µM	jeweils 0,5 µM	jeweils 0,5 µM
Template DNA	10-200 ng	50-200 ng	100 ng
Polymerase	1 U	1 U	1 U
DMSO	-	-	0 - 10 %
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl

Die PCR-Protokolle wurden in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase, der erwarteten Amplifikatlänge sowie dem Schmelzpunkt der Primer (Tab. 14) modifiziert. Die Primer wurden von MWG Biotech synthetisiert und der Schmelzpunkt nach Herstellerangaben für die Berechnung der Annealingtemperatur verwendet.

Tab. 14: PCR-Protokolle für die Amplifikation von DNA.

Schritt	Phusion (Finnzymes)	<i>PfuUltra</i> (Stratagene)	<i>Taq</i> (Abgene)
(1) Initiale Denaturierung	98°C, 30 sec	95°C, 2 min	95°C, 3 min
(2) Denaturierung*	98°C, 10 sec	95°C, 30 sec	95°C, 30 sec
(3) Annealing*	T <sub>m</sub> + 3°C, 30 sec	T <sub>m</sub> - 5°C, 30 sec	T <sub>m</sub> - 5°C, 30 sec
(4) Elongation*	72°C, 15-30 sec/kb	72°C, 1 min/kb	72°C, 1 min/kb
(5) Finale Elongation	72°C, 10 min	72°C, 10 min	72°C, 10 min

\* Die Zyklen 2-4 wurden 20-30 mal wiederholt. T<sub>m</sub> = Schmelzpunkt

### 3.3.2 Konstruktion von Plasmiden

*E. coli* Plasmide wurden wie auf den folgenden Seiten beschrieben erstellt und durch Kontrollverdau und Sequenzierungen bestätigt. Punktmutanten der Plasmide wurden wie beschrieben mit dem Ursprungsplasmid als Template und spezifischen Mutageneseprimern (Tab. 7) hergestellt. Die Klonierung erfolgte entweder aus Plasmiden oder aus genomischer DNA von *E. coli* MG1655. Die Ribosomenbindestelle wurde für Klonierungen in pBAD18K\* und pBAD30 aus anderen Vektoren durch Umklonierung transferiert, da sie in pBAD18K\* und pBAD30 fehlt.

#### Plasmide für Funktionskomplementation, Expression und Nachweis von Proteinen

Plasmidkodiertes DctA unter der Kontrolle des natürlichen Promotors (pMW457; Bauer, 2010) und die drei Punktmutanten (pMW1341, pMW1342, pMW1343) wurden für die Regulationskomplementation eines chromosomal *dctA*-deletierten Stamms eingesetzt.

DctA wurde in verschiedene Plasmide mit unterschiedlichen Resistenzkassetten, Kopienzahlen, Protein-Tags und Promotoren kloniert, um die optimale Expressionsstärke sowie einen geeigneten Proteinnachweis zu bestimmen. Als Vektoren dienten pET28a, pASK-IBA3<sup>+</sup>, pBAD18K\* und pBAD30. Das Strep-Tag und das His6-Tag wurden als Protein-Tags verwendet. Die Klonierung für DctA mit einem C-terminalen Strep-Tag (pMW1104) erfolgte mit den Primern *dctA*-BamHI-for und *dctA*-XhoI-rev aus dem Plasmid pMW457 über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xho*I. DctA mit Strep-Tag wurde anschließend in pBAD18K\* (pMW1198) und pBAD30 (pMW1199) durch Umklonierung aus pMW1104 mit *Xba*I und *Hind*III erstellt. Die Klonierung von DctA mit einem N- und C-terminalen His6-Tag aus pMW505 in pBAD18K\* (pMW1194) und pBAD30 (pMW1195) erfolgte mit den Primern *dctA*-his-pBAD\_f und *dctA*-his-pBAD\_r DctA über *Xba*I und *Hind*III. Die Einzelmutanten pMW1271 bis pMW1277, pMW1476, pMW1477, pMW1484, pMW1485 und pMW1503 wurden durch Mutagenese aus pMW1194 erstellt. Die cysteinfreie Variante von DctA<sub>C55S,C225S,C230S,C285S</sub> (pMW1024) wurde durch vierfache Mutagenese des Plasmids pMW505 (Bauer, 2010) erstellt und ebenso in pBAD18K\* (pMW1196) und pBAD30 (pMW1197) umkloniert wie wildtypisches DctA.

DcuS mit einem N-terminalen His6-Tag wurde aus pMW151 mit den Primern DcuS-pBAD-XbaI-f und DcuS-pBAD-HindIII-r amplifiziert, danach mit *Xba*I und *Hind*III restringiert und in pBAD18K\* (pMW1390) oder pBAD30 (pMW1391) kloniert.

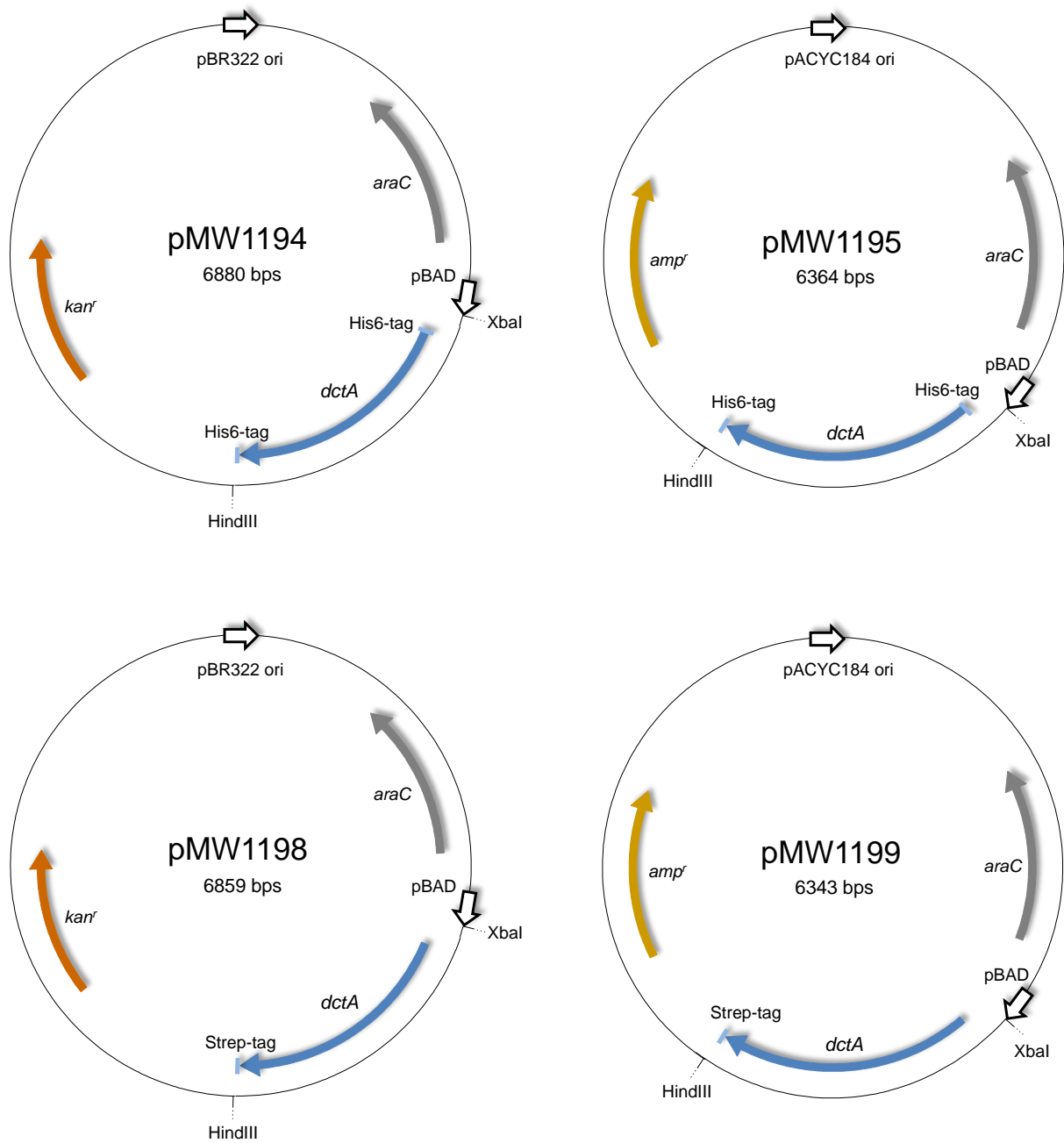


Abb. 4: **Expressionsplasmide für DctA mit Protein-Tag.** Die Plasmide pMW1194 und pMW1195 kodieren für DctA mit einem N- und C-terminalen His6-Tag in pBAD18K\* bzw. pBAD30. Die Plasmide pMW1198 und pMW1199 kodieren für DctA mit einem C-terminalen Strep-Tag in pBAD18K\* bzw. pBAD30.

## Topologiebestimmung: PhoA-/LacZ-Fusionsplasmide

LacZ wurde aus pT7-5-putP-lacZ und PhoA aus pT7-5-phoA mit lacpho2-PstI-for und lacZ2-rev amplifiziert, mit PstI plus HindIII geschnitten, in pBAD18K\* kloniert und ergab so lacZ in pBAD18K\* (pMW1105) und phoA in pBAD18K\* (pMW1106). Eine Reihe C-terminal verkürzter DctA-Versionen wurde aus pMW1104 mit dctA1-pBAD\_f2 und dem entsprechenden reversen Primer dctA-xxx-pBAD\_r (vgl. Tab. 9) amplifiziert. Die Amplifikate wurden über XbaI und SalI geschnitten und in pMW1105 oder pMW1106 ligiert, was zu den Endplasmiden führte.

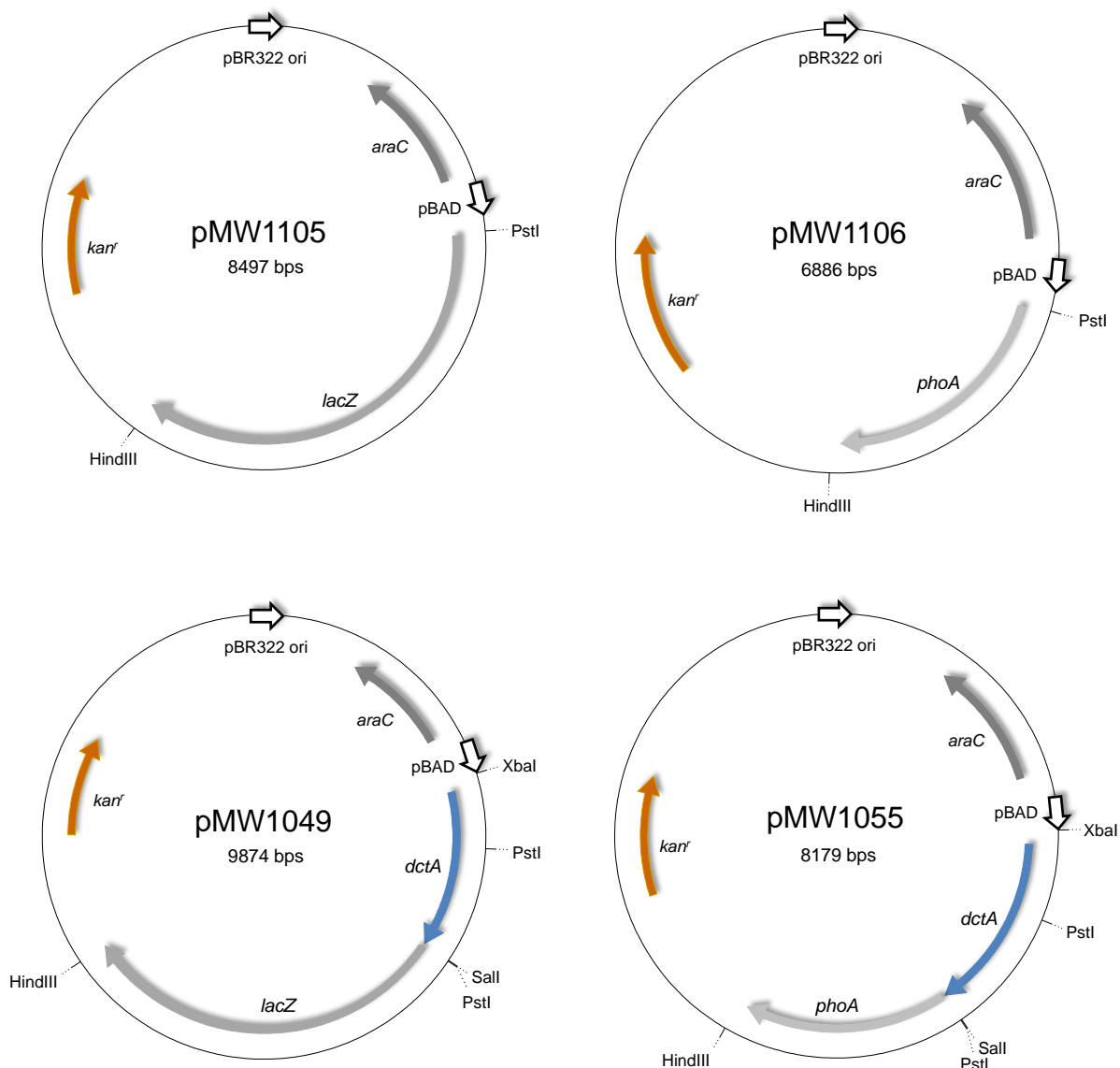


Abb. 5: Plasmide für die Topologiebestimmung von DctA. Die Plasmide pMW1105 und pMW1106 enthalten lacZ bzw. phoA. Die Plasmide pMW1049 und pMW1055 kodieren für Vollängen-DctA mit einer C-terminalen Fusion von LacZ (pMW1049) oder PhoA (pMW1055). Als Vektor wurde pBAD18K\* verwendet.



Plasmide für das Bacterial Two-Hybrid (BACTH)-System

Die Fragmente T25 und T18 wurden in Vektoren mit unterschiedlicher Resistenzkassette und einem unterschiedlichen Replikationsursprung kloniert, um Selektierbarkeit und genetische Stabilität zu gewährleisten (Abb. 6; Karimova et al., 1998). Die beiden T25-Plasmide besitzen einen *p15*-Replikationsursprung (*p15 ori*) und eine Kanamycin-Resistenzkassette (*kan<sup>r</sup>*). Der Vektor pKT25 trägt die multiple Klonierungsschnittstelle (MCS) nach dem T25-Fragment und führt somit zu einer N-terminalen Fusion des Zielproteins an T25. Der Vektor pKNT25 ermöglicht die Fusion des C-Terminus vom Zielprotein an T25. Die beiden T18-Plasmide besitzen einen *colE1*-Replikationsursprung (*colE1 ori*) und eine Ampicillin-Resistenzkassette (*amp<sup>r</sup>*). Der Vektor pUT18C trägt die multiple Klonierungsschnittstelle (MCS) nach dem T18-Fragment und führt zu einer N-terminalen Fusion des Zielproteins an T18. Der Vektor pUT18 ermöglicht die Fusion von dem C-Terminus des Zielproteins an T18.

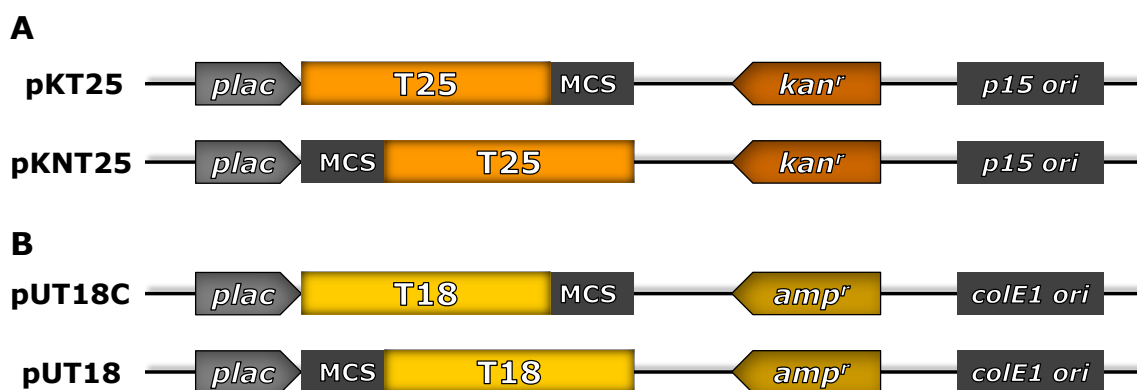


Abb. 6: **Schematischer Aufbau der Ausgangsvektoren des BACTH-Systems.** Alle Plasmide liegen unter Kontrolle des *plac*-Promotors und sind IPTG-induzierbar. **(A)** Die beiden T25-Plasmide besitzen einen *p15*-Replikationsursprung (*p15 ori*) und eine Kanamycin-Resistenzkassette (*kan<sup>r</sup>*). Das Plasmid pKT25 kodiert für N-terminale Proteinfusionen, das Plasmid pKNT25 für C-terminale Proteinfusionen. **(B)** Die beiden T18-Plasmide besitzen einen *colE1*-Replikationsursprung (*colE1 ori*) und eine Ampicillin-Resistenzkassette (*amp<sup>r</sup>*). Das Plasmid pUT18C kodiert für N-terminale Proteinfusionen, das Plasmid pUT18 für C-terminale Proteinfusionen. MCS = Multiple Klonierungsschnittstelle.

## CitA, CitB

*CitA* wurde aus genomischer DNA mit den Primern pUT18C-citA-f und citA-pUT18-r amplifiziert, mit *Xba*I plus *Eco*RI restringiert und für das Konstrukt *citA-T18* (pMW1026) in pUT18 ligiert. *CitB-T25* (pMW1358) entstand durch Amplifikation von *citB* aus genomischer DNA mit den Primern pKT25-citB-f2 und citB-pKNT25-r, Restriktion über *Bam*HI plus *Eco*RI und Ligation in pKNT25. *T25-citB* (pMW1359) entstand durch Ligation in pKT25 nach Amplifikation von *citB* aus genomischer DNA mit den Primern pKT25-citB-f2 und pKT25-citB-r2 und Restriktion über *Bam*HI plus *Eco*RI. *T18-citB* (pMW1442) wurde durch Ligation des gleichen Produktes in pUT18C erstellt.

## DctA

Eine Serie von DctA-Konstrukten wurde generiert. Vollängen *dctA-T25* (pMW858) und *dctA-T18* (pMW918) wurden durch Amplifikation von genomischer DNA mit den Primern pKT25-dctA\_B\_for und dctA-pKNT\_E\_rev nach Restriktion durch *Bam*HI plus *Eco*RI und Ligation in pKNT25 bzw. pUT18 erstellt. *T25-dctA* (pMW856) und *T18-dctA* (pMW917) wurden durch Amplifikation von genomischer DNA mit den Primern pKT25-dctA\_B\_for und pKT25-dctA\_E\_rev nach Restriktion durch *Bam*HI plus *Eco*RI und Ligation in pKT25 bzw. pUT18C kloniert.

C-terminal verkürzte Varianten von DctA wurden aus pMW858 durch Amplifikation mit pKNT25-seq\_for und dem entsprechenden reversen Primer dctA-xxx-NT25\_r (vgl. Tab. 10) über die Schnittstellen *Bam*HI plus *Eco*RI in pKNT25 oder pUT18 kloniert. Das führte zu den pKNT25-Plasmiden pMW931 bis pMW935, pMW1175 bis pMW1177 und pMW1303 sowie den pUT18-Plasmiden pMW1178 bis pMW1180 und pMW1392.

N-terminal verkürzte Varianten von DctA mit N-terminaler Fusion wurden aus pMW856 durch Amplifikation mit KT25-dctA-428\_r und dem entsprechenden forward Primer KT25-dctAxxx\_f (vgl. Tab. 10) über die Schnittstellen *Bam*HI plus *Eco*RI in pKNT25 kloniert. Daraus entstanden die pKT25-Plasmide pMW1002 bis pMW1005.

N-terminal verkürzte Varianten von DctA mit C-terminaler Fusion wurden aus pMW858 durch Amplifikation mit pKNT25-seq\_rev und dem entsprechenden forward Primer dctA400-NT25\_f bzw. dctA364-NT25\_f über die Schnittstellen *Bam*HI plus *Eco*RI in pKNT25 (*dctA*<sub>400-428</sub>-T25, pMW1126; *dctA*<sub>362-428</sub>-T25, pMW1641) oder pUT18 (*dctA*<sub>400-428</sub>-T18, pMW1227; *dctA*<sub>362-428</sub>-T18, pMW1643) kloniert. PMW1641 und pMW1643 wurden anschließend zusätzlich N-terminal mit MalE fusioniert. Dazu wurde *malE* aus genomischer

DNA amplifiziert, mit *HindIII* plus *PstI* restringiert, und in pKNT25 für *malE-T25* (pMW1645), in pMW1641 für *malE-dctA<sub>362-428</sub>-T25* (pMW1647), in pUT18 für *malE-T18* (pMW1648) und in pMW1643 für *malE-dctA<sub>362-428</sub>-T18* (pMW1648) ligiert.

#### DcuS

*DcuS* aus pMW428 wurde mit *PstI* plus *EcoRI* restringiert und für das Konstrukt *dcuS-T25* (pMW919) in pKNT25 ligiert.

#### DcuB

*DcuB* wurde von genomischer DNA mit den Primern pKT-dcuB20\_P\_for und pKT-dcuB20\_E\_rev amplifiziert, mit *PstI* plus *EcoRI* restringiert und für das Konstrukt *T25-dcuB<sub>20-446</sub>* (pMW857) in pKT25 ligiert. DNA für N-terminal verkürzte Varianten von DcuB mit C-terminaler Fusion wurde aus pMW561 mit den Primern *HindIII\_dcuB-fo* und dem entsprechenden reversen Primer *dcuBxxx-rev* (vgl. Tab. 10) amplifiziert, mit *HindIII* und *BamHI* restringiert und in pKNT25 ligiert (pMW1077 bis pMW1080). DNA für das DcuB-Sandwich-Konstrukt mit einer internen T25-Fusion wurde aus pMW425 mit den Primern *dcuB-NT25\_f* und *dcuB-211-NT25\_r* amplifiziert, mit *PstI* und *BamHI* restringiert und in pKNT25 zu *dcuB<sub>1-211</sub>-T25* (pMW1027) ligiert. Anschließend wurden in pMW1027 durch Mutagenese mit den Primern *dcuB1-211-mut\_f* und *dcuB1-211-mut\_r* Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bst1107I* und *XhoI* eingeführt und das Stoppcodon von T25 entfernt. Dieses Plasmid wurde mit der zweiten Genhälfte von *dcuB* ligiert, nachdem diese aus pMW425 mit den Primern *dcuB213-446\_Bs-for* und *dcuB213-446\_X-rev* amplifiziert und mit *Bst1107I* und *XhoI* geschnitten wurde. Das finale DcuB-Sandwich-Konstrukt *dcuB<sub>1-211</sub>-T25-213-446* (pMW1028) kodiert für die N-terminale Hälfte von DcuB, gefolgt von T25 und der C-terminalen Hälfte von DcuB.

#### Tsr

*Tsr-T25* (pMW1443) und *tsr-T18* (pMW1446) entstanden durch Amplifikation von *tsr* aus genomischer DNA mit den Primern *BACTH-tsr\_f* und *pKNT25-tsr\_r*, gefolgt von einer Restriktion über *BamHI* plus *EcoRI* und Ligation in pKNT25 bzw. pUT18. *T25-tsr* (pMW1444) entstand durch Ligation in pKT25 nach Amplifikation von *tsr* aus genomischer DNA mit den Primern *BACTH-tsr\_f* und *pKT25-tsr\_r*, gefolgt von einer Restriktion über *BamHI* plus *EcoRI*. *T18-tsr* (pMW1445) wurde durch Ligation des gleichen Produktes in pUT18C erstellt.

### Plasmide für Fluoreszenzmikroskopie

Als Ausgangsplasmid für Fluoreszenzmessungen wurde pMW526 verwendet. Durch gerichtete Mutagenese wurden daraus die Plasmide pMW1338 bis pMW1340 hergestellt.

### 3.3.3 Stammkonstruktion durch P1-Transduktion und Eliminierung der Resistenzkassette

#### Stammkonstruktion durch P1-Transduktion

Mit Hilfe des unspezifisch transduzierenden Phagen P1kc können Gene von einem *E. coli* Stamm auf einen anderen übertragen werden. Bei der Inaktivierung von Genen durch Resistenzkassetten wird das entsprechende Gen durch ein Resistenzgen ersetzt. Positive Kolonien werden anschließend über diese Resistenz selektioniert und durch PCR überprüft.

Das Lysat von P1kc enthält ungefähr  $10^{10}$  Phagen pro ml und wurde für die Versuche um den Faktor  $10^{-5}$  verdünnt. Aerobe Übernachtskulturen des Donorstamms von *E. coli* mit der zu transferierenden Mutation wurden in 5 ml LB-Medium gezüchtet und nach Zugabe von 5 ml MC-Puffer für 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Es wurden 100 µl der Phagenkultur mit 100 µl des *E. coli* Stamms für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und danach zu 50°C warmem R-Top-Agar pipettiert und auf eine R-Agarplatte gegossen. Die Platten wurden bis zum Eintritt der konfluenten Lyse bei 37°C bebrütet, anschließend mit 2 ml LB-Medium inkubiert und die Flüssigkeit plus R-Top-Agar in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 10 Minuten wurden 500 µl Chloroform hinzugefügt, kräftig gemischt und weitere 10 Minuten inkubiert. Die Suspension wurde für 15 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert (Eppendorf 5403). Der klare Überstand enthält  $10^{10}$  Phagen und kann mit 50 µl Chloroform pro ml Lösung mehrere Monate bei 4°C gelagert werden. Für die Transduktion wurde der Rezipientenstamm als Übernachtskultur aerob bei 37°C in LB-Medium gezüchtet. Nach Zugabe von 5 ml MC-Puffer und erneuter Inkubation bei 37°C für 30 Minuten wurde die komplette Kultur abzentrifugiert (1 min, 10000 x g, Eppendorf 5403) und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. 100 µl dieser Suspension wurden mit 100 µl Phagensuspension der Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  plus 10 µl 0,1 M CaCl<sub>2</sub> gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Infektion wurde mit 200 µl 0,1 M Na<sub>3</sub>-Citrat und 500 µl LB-Medium durch Schütteln für eine Stunde bei 37°C gestoppt. Der komplette Ansatz wurde eingengt und auf Platten mit Antibiotikum ausplattiert um positive Kolonien zu selektionieren. Die so erworbenen Klone wurden erneut durch Antibiotika selektiert und über PCR mit Primern innerhalb der Resistenzkassette kombiniert mit außerhalb liegenden Primern amplifiziert.

### Eliminierung von Resistenzkassetten (Datsenko und Wanner, 2000)

In allen Stämmen der Keio Collection sind die Einzelmutanten durch „Knockout“ der Gene entstanden. Dabei wurden die Gene durch FRT-flankierte (Flp recognition target) Resistenzkassetten ersetzt. Das Plasmid pCP20 kodiert für eine Flp-Rekombinase, die nach Aktivierung zu einer homologen Rekombination zwischen FRT-flankierten Stellen und damit zu einer Deletion der internen Resistenzkassette führt.

Die Stämme, bei denen die Kanamycin-Resistenzkassette eliminiert werden sollte, wurden als elektrokompetente Zellen präpariert und mit pCP20 transformiert. Nach Wachstum bei 30°C über Nacht auf LB-Platten mit Ampicillin wurden einige der entstandenen Kolonien in LB-Medium ohne Antibiotikum bei 43°C gezüchtet und anschließend auf LB-Platten ausplattiert. Die Kolonien wurden durch fehlendes Wachstum auf Ampicillin und Kanamycin sowie durch PCR bestätigt und dienten als Ausgangsstämme für die Konstruktion von Mehrfachmutanten.

#### 3.3.4 Transkriptionsanalyse

Für die Transkriptionsanalyse von *yfcC* wurde die Gesamt-RNA isoliert und anschließend mit einer reversen Transkriptase und dem spezifischen Primer *yfcC\_rev\_RT* in cDNA umgeschrieben.

#### RNA-Isolation

Die RNA wurde aus dem *E. coli* AJW678 nach aerober Zucht in eM9 + 50 mM Glukose innerhalb der exponentiellen Phase ( $OD_{578nm} = 0,7$ ) isoliert. 500 µl der Kultur wurde mit 1 ml RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen) versetzt und die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und gereinigt. Der Gehalt an RNA wurde mittels Biophotometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

#### RT-PCR und PCR

0,1 µg der Gesamt-RNA wurden mit dem Revertaid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) unter Verwendung von 15 pmol des genspezifischen Primers *yfcC\_rev\_RT* (ohne unspezifische Primer) revers transkribiert. 2 µl der so erhaltenen Erstrang-cDNA wurde direkt als Template für die PCR mit der Taq-Polymerase eingesetzt. Um die Transkriptionseinheit von *yfcC* zu bestimmen wurden verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Primerkombinationen amplifiziert.

## 3.4 Biochemische Methoden

### 3.4.1 Das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System

#### Funktionsweise

Das Bacterial Two-Hybrid System wird für die Messung von Protein-Protein-Interaktionen verwendet (Karimova et al., 1998) und besteht aus den zwei Domänen T25 und T18 der bakteriellen Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis*. Im Wildtyp liegen T25 und T18 als ein Protein vor und bilden cAMP aus ATP (Abb. 7A). Bei einer Trennung der Domänen in zwei separate Proteine verlieren sie ihre katalytische Aktivität (Abb. 7B).

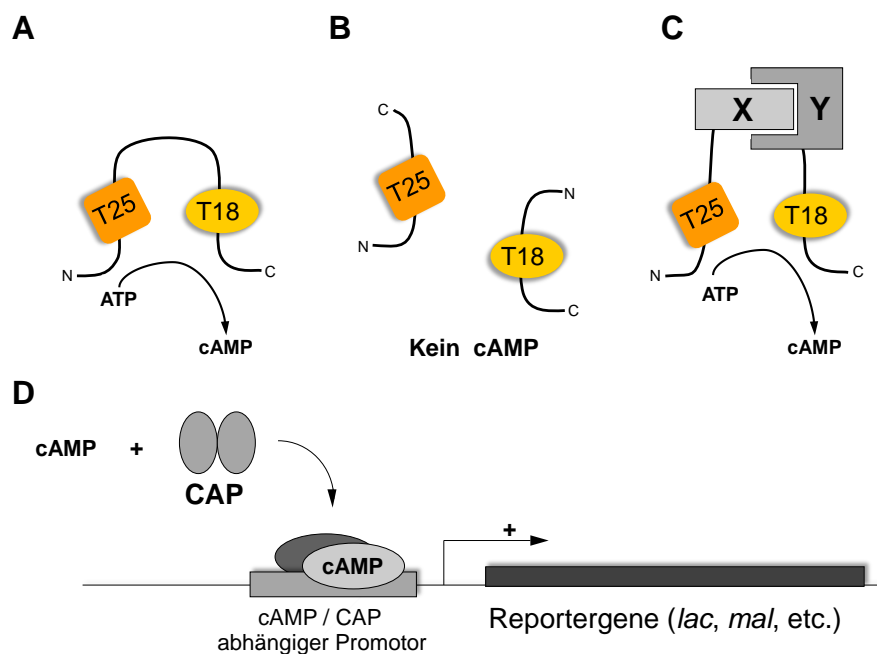


Abb. 7: Schematische Darstellung der Funktionsweise des BACTH-Systems (Karimova et al., 1998). (A) T25 und T18 bilden zusammen die funktionale Adenylatzyklase von *Bordetella pertussis*. (B) Die Adenylatzyklase ist nicht aktiv, wenn T25 und T18 als getrennte Proteine vorliegen. (C) Bei einer Interaktion der Proteine X und Y, die mit T25 bzw. T18 fusioniert vorliegen, wird die Funktion der Adenylatzyklase wiederhergestellt. (D) Die funktionale Adenylatzyklase produziert cAMP, das zu einer verstärkten Expression von Reporter Genen führt.

Wird die Domäne T25 an das Protein X und die Domäne T18 getrennt davon an das Protein Y fusioniert, können die Domänen ihre Funktion wiedererlangen, wenn die Proteine X und Y miteinander interagieren (Abb. 7C). Interagieren X und Y jedoch nicht, liegen auch T25 und T18 inaktiv vor (nicht gezeigt). In dem Adenylatzyklase-negativen *E. coli* Stamm BTH101 kann die Interaktion zweier Proteine X und Y über die Bildung von cAMP ermittelt werden.

Der Transkriptionsfaktor CAP (catabolite activator protein) wird durch cAMP aktiviert und steigert in seiner aktiven Form die Expression verschiedener Zielgene. Unter diesen Genen befinden sich unter anderem das *lac*-Operon und das *mal*-Operon, die als Reportergene verwendet werden können. Sie kodieren für Enzyme des Laktose- bzw. Maltose-Abbaus. Als Reporter wurde hier die  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*) verwendet, deren Aktivität quantitativ in einer chromogenen Reaktion gemessen werden kann und als Maß für die Protein-Protein-Interaktion dient.

### Interaktionsmessungen

Der Test auf Protein-Protein-Interaktion wurde in dem Adenylatzyklase-negativen *E. coli* Stamm BTH101 durchgeführt. Elektrokompente Zellen von BTH101 (50  $\mu$ l) wurden mit jeweils 15 ng eines T25-Fusionsplasmids und eines T18-Fusionsplasmids transformiert und auf LB-KAXI-Agar ausplattiert. Die Protein-Protein-Interaktion wurde anschließend sowohl qualitativ durch Blaufärbung als auch quantitativ über die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt.

#### 3.4.2 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität und der alkalischen Phosphataseaktivität

##### Qualitative und quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

Der qualitative Nachweis für die Interaktion im BACTH-System erfolgte mit dem chromogenen Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (X-Gal). Dieses wird von der  $\beta$ -Galaktosidase zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. In Anwesenheit von Sauerstoff erfolgt eine Umwandlung in den blauen Farbstoff 5,5-Dibrom-4,4-dichlor-Indigo.

Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität für das BACTH-System, für die Topologieexperimente und für die Expressionsmessungen wurde mit dem chromogenen Substrat ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG) nach Miller et al. (1992) quantifiziert. ONPG wird von der  $\beta$ -Galaktosidase in Galaktose und ortho-Nitrophenol hydrolysiert und kann anschließend bei einer Extinktion von 420 nm gemessen werden. Exponentiell wachsende Zellen wurden direkt für die Messungen eingesetzt; bei einer höheren  $OD_{578nm}$  wurden die Zellen geerntet und für die Messungen auf eine  $OD_{578nm} = 0,5-0,7$  verdünnt. Mindestens vier unabhängige Kulturen wurden jeweils in einer Vierfachbestimmung gemessen.

### Quantitative Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität

Für Topologieexperimente wurden PhoA-Fusionen exprimierende Zellen durch Zentrifugation (8000 x g, 4 min, Eppendorf 5403) geerntet und in Puffer PI zu einer  $OD_{578nm} = 2,5$  resuspendiert. Für jede Messung wurden 200  $\mu$ l der Suspension zu 800  $\mu$ l Puffer PII gegeben und nach Zugabe von 50  $\mu$ l Chloroform und 25  $\mu$ l 0,1 % SDS durch vortexen permeabilisiert. Nach zehnmütiger Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion mit 200  $\mu$ l p-Nitrophenyl-Phosphat-Lösung gestartet und bei deutlicher Gelbfärbung oder nach maximal 30 Minuten durch 500  $\mu$ l 2,5 M  $K_2HPO_4$  gestoppt. Nach Zentrifugation (13 000 x g, 10 min; Biofuge pico, Heraeus) wurde die Extinktion des Überstands bei 420 nm gemessen.

### Berechnung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität und der alkalischen Phosphataseaktivität

Die Aktivitäten der Reporterproteine wurden in Miller-Units (MU) berechnet.  $\Delta E_{420nm}$  ist die Extinktion der Probe bei 420 nm abzüglich des Blindwerts. Diese wird durch das Produkt der vergangenen Zeit, des Volumens und der optischen Dichte bei 578 nm abzüglich des Blindwerts ( $\Delta OD_{578nm}$ ) dividiert.

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

#### 3.4.3 Expression und Nachweis von DctA durch SDS-Gelelektrophorese und Antikörper

##### Expression und *in vivo* Cross-Linking von DctA: Zellernte und Probenbehandlung

Für die Suche nach der optimalen Expressionsbedingung von DctA wurden verschiedene *dctA*-kodierende Plasmide in dem *E. coli* Stamm C43 exprimiert. Am Zuchtende wurde 1 ml der Zellen durch Zentrifugation (13000 x g, 2 min; Biofuge pico, Heraeus) geerntet, mit 1 ml PBS-Puffer pH 7,5 gewaschen, erneut zentrifugiert und je nach Auftragsmenge auf 0,526-5,26  $\mu$ g Protein pro  $\mu$ l in PBS-Puffer verdünnt. 19  $\mu$ l (= 10-100  $\mu$ g) Protein wurden 1:1 mit SDS-Auftragspuffer versetzt, für 5 Minuten bei 42°C erhitzt und anschließend komplett für die SDS-Gelelektrophorese (200 V, 60-80 min; Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad) eingesetzt.

Für Cross-Linking Experimente mit DctA wurde der homobifunktionale Cross-Linker DSS (Armlänge = 11,4 Å) frisch in DMSO gelöst und 1  $\mu$ l DSS auf 19  $\mu$ l Probe (= 10  $\mu$ g Gesamtprotein) in Endkonzentrationen zwischen 60 und 480  $\mu$ M eingesetzt. Bei einer Temperatur von 20°C wurden die Ansätze für 15 Minuten inkubiert und die Reaktion wurde



anschließend mit 2 µl 1 M Tris/HCl (pH 7,6) gestoppt. Die Proben wurden 1:1 mit SDS-Auftragspuffer versetzt, für 5 Minuten bei 42°C erhitzt und anschließend komplett für die SDS-Gelelektrophorese (200 V, 60-80 min; Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad) verwendet.

#### Nachweis der Membranintegration von DctA: Zellernte und Probenbehandlung

Für den Nachweis der Membranintegration von DctA-Varianten durch Saccharosegradienten-ultrazentrifugation wurde der Stamm MC4100 verwendet. 100 ml der Hauptkultur wurden durch Zentrifugation (4500 x g, 2 min, Beckman J2-MC, Rotor F14B) geerntet, in 20 ml Puffer MI gewaschen, erneut zentrifugiert und in 7 ml Puffer MI aufgenommen. Die Zellen wurden in zwei bis drei Durchgängen bei 20000 Psi in der French Press aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (11000 x g, 10 min, 4°C, Eppendorf 5403) entfernt.

Der Überstand enthielt sowohl die lösliche als auch die Membranproteinfraktion und wurde für die Saccharosegradientenultrazentrifugation eingesetzt. Der Saccharosegradient wurde in Gradientenröhrchen (OptiSeal Tubes, Beckman Coulter) als jeweils 1,1 ml 45 %, 20 % und 10 % Saccharoselösung in Puffer MII angesetzt. Auf die oberste Schicht wurden 1,6 ml Probe pipettiert und anschließend für zwei Stunden bei 65000 Upm in einem Vertikalrotor (VTi65, Beckman Coulter) in einer Coulter Optima LE-80K Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) bei langsamer Beschleunigung und Abbremsung zentrifugiert. Fraktionen von 500 µl wurden gesammelt. Von jeder Fraktion wurden 15 µl Probe mit 15 µl Auftragspuffer gemischt, für 5 Minuten auf 40°C erhitzt und dann in einem 12 % SDS-Gel (200 V, 60-80 min; Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad) aufgetrennt.

#### Western Blot und Antikörperfärbung

Aufgrund der niedrigen Expression von DctA erfolgte die Detektion nie direkt im SDS-Gel, sondern durch einen Western Blot mit anschließender Antikörperfärbung. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels „semi-dry Blotting“ auf eine Nitrocellulosemembran (Protran, Schleicher & Schuell) transferiert. SDS-Gel und Nitrocellulosemembran wurden in drei Lagen mit Kathoden- und drei Lagen mit Anodenpuffer getränkten Filterpapieren zwischen Graphitelektroden (Pegasus Phase, Lübeck) eingebettet. Geblottet wurde für zwei Stunden bei konstanter Stromstärke. Die eingestellte Stromstärke I errechnete sich nach der Formel:

$$I[\text{mA}] = \text{Membranfläche} [\text{cm}^2] * 0,8$$

Nach dem Transfer auf die Nitrocellulosemembran wurde diese mit Färbelösung bestehend aus 3 % Trichloressigsäure und 2 % Ponceau S gefärbt, um Proteinbanden sichtbar zu machen. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend über Nacht bei 4°C mit Blockierungspuffer (BI) entfärbt und blockiert. Nach drei Waschschrritten für eine Minute in 20 ml Waschpuffer (BIII) erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper. Als Primärantikörper wurden entweder Anti-His-, Anti-Strep-, Anti-DctA- oder Anti-PhoA-Antikörper in Puffer BII gelöst und wie angegeben verwendet. Nach ein- bis zweistündiger Inkubation bei 20°C wurde die Membran drei Mal für fünf Minuten mit Puffer BIII gewaschen und danach mit Sekundärantikörper (gelöst in BII) für 2 Stunden bei 20°C inkubiert. Nach zusätzlichen Waschschrritten in Puffer BIII zur Entfernung des überschüssigen Antikörpers wurden spezifisch an Protein gebundene, HRP-gekoppelte (= horseradish peroxidase) Antikörper durch Chlornaphthol oder Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Mit der Chlornaphthol-Methode wurde der Blot für 15-30 Minuten in Entwicklerlösung getaucht und anschließend eingescannt. Für den wesentlich sensitiveren Nachweis durch Chemilumineszenz wurde Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat (Millipore) verwendet. 400 µl des Luminol Reagenzes wurden mit 400 µl der dazugehörigen Peroxidlösung gemischt und auf den Blot aufgetragen. Die Lumineszenz wurde mit einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL) detektiert und entwickelt.

#### 3.4.4 *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie

Membranproteine können selbst durch einzelne Mutationen in ihrer Expression und Faltung gestört werden. Um den richtigen Einbau von DctA-Varianten in die Membran zusätzlich zur Saccharosedichtegradientenultrazentrifugation zu testen, wurden Fusionsproteine dieser Varianten mit dem Fluorophor YFP erstellt. Nur richtig gefaltete und in die Membran integrierte Proteine weisen eine Fluoreszenz auf (Geertsma et al., 2008). Wildtypisches DctA und verschiedene Varianten wurden als C-terminale YFP-Fusion in JM109 transformiert und exprimiert. 1 ml der Kultur wurde abzentrifugiert und in 600-1000 µl PBS-Puffer resuspendiert. Davon wurden 5 µl durch 1%ige Agarose (gelöst in PBS) auf einem Objektträger immobilisiert und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Biozero BZ-8000, KEYENCE).

### 3.4.5 Transportmessungen

#### Vorbereitung der Zellsuspension

Die Zellen wurden nach aerober Zucht bei 37°C in eM9 mit 50 mM Acetat als einziger Kohlenstoffquelle bei einer  $OD_{578nm} = 0,5-0,7$  geerntet und ab diesem Zeitpunkt bis zur Verwendung ständig gekühlt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (10000 x g, 20 min, 4°C, Eppendorf 5403). Anschließend wurden die Zellen mit Puffer TI resuspendiert, erneut zentrifugiert, in Puffer TI auf eine  $OD_{578nm} = 4$  eingestellt und unter ständigem Rühren auf Eis gehalten. Unmittelbar vor den Messungen wurden alle benötigten Substanzen auf die Versuchstemperatur von 23°C gebracht. Die Zellsuspension wurde fünf Minuten bei 23°C vorgewärmt und anschließend fünf Minuten mit 20 mM Glukose (Endkonzentration) energetisiert.

#### Messungen

Die Acetataufnahme wurde mit 20-200  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetat (Endkonzentration) gestartet und nach definierten Zeitabständen gestoppt. Pro Ansatz wurden 100  $\mu\text{l}$  Lösung mit 900  $\mu\text{l}$  eiskaltem 0,1 M LiCl gestoppt und anschließend unter Vakuumfiltration (Hoefer FH225V Ten-Place Filter Manifold, Pharmacia Biotech) auf einem Cellulosemischesterfilter (ME24, Ø25 mm, Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schuell) unter zweimaligem Waschen mit 1 ml 0,1 M LiCl getrocknet. Die Filterpapiere wurden in 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint ecoplus, Roth) aufgelöst und im Szintillationszähler (Liquid Scintillation System, LS 6000SC, Beckman) gemessen. Als Leerwert für unspezifische Aufnahme diente energetisierte Zellsuspension, die direkt in die Stopplösung pipettiert und dann erst mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetat versetzt wurde.

#### Berechnung der Transportaktivität

Die Radioaktivität des verwendeten [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetats entsprach 2000 dpm/nmol. Die absolute Aufnahme des [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetats wurde in [ $\mu\text{mol/g}$  Trockengewicht] angegeben. Zur Berechnung der Aufnahmeaktivität wurde die  $OD_{578nm}$  der Zellsuspensionen gemessen. Für *E. coli* entspricht eine  $OD_{578nm}$  von eins einem Trockengewicht (= TG) von 281 mg. Nach Abzug des jeweiligen Blindwertes (BW) von den gemessenen dpm-Werten konnte so die Aufnahmeaktivität in  $\mu\text{mol/g}$  TG berechnet werden.

$$\text{Aufnahme an } [^{14}\text{C}]\text{-Acetat in } \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \text{ TG} \right] = \frac{(\text{Radioaktivität der Probe-BW}) [\text{dpm}] * 10000}{2000 \left[ \frac{\text{dpm}}{\text{nmol}} \right] * OD_{578nm} * 281 [\text{mg TG}]}$$

## 3.5 Bioinformatische Methoden

### Datenbanken

EcoCyc:	<a href="http://www.ecocyc.org">http://www.ecocyc.org</a>
EcoGene:	<a href="http://www.ecogene.org">http://www.ecogene.org</a>
KEGG:	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>
NCBI:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
RCSB PDB:	<a href="http://www.pdb.org">http://www.pdb.org</a>
Uniprot:	<a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>

### Literatursuche

NCBI, PubMed:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez</a>
---------------	---

### Primärsequenzvergleiche

BLAST:	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
ClustalW2:	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
Spidey:	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/</a>

### Sekundärstrukturvorhersage

MEMSAT-SVM:	<a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/</a>
-------------	---

### Topologievorhersagen

OCTOPUS:	<a href="http://octopus.cbr.su.se/">http://octopus.cbr.su.se/</a>
Phobius:	<a href="http://phobius.sbc.su.se/">http://phobius.sbc.su.se/</a>
TMHMM:	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
TMPRED:	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>
TOPCONS:	<a href="http://topcons.cbr.su.se/">http://topcons.cbr.su.se/</a>
TOPPRED:	<a href="http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred">http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred</a>

### 3D-Strukturvorhersagen

QUARK:	<a href="http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/">http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/</a>
SWISS-MODEL:	<a href="http://swissmodel.expasy.org/">http://swissmodel.expasy.org/</a>

### Visualisierung von 3D-Strukturen

Chimera:	<a href="http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/">http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/</a>
PyMOL:	<a href="http://www.pymol.org">http://www.pymol.org</a>

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Topologie von DctA aus *Escherichia coli*

Als Topologie eines integralen Membranproteins wird die Orientierung und Lage von Transmembranhelices und löslichen Proteinanteilen bezeichnet. Die Topologiebestimmung ist ein wichtiges Werkzeug für die Analyse von Membranproteinen, da die bei löslichen Proteinen üblichen Methoden wie z.B. 3D-Kristallstrukturanalysen extrem schwierig durchzuführen sind (Loll, 2003; Dobrovetsky et al., 2005). Es gibt eine relativ große Anzahl verschiedener Algorithmen zur *in silico* Vorhersage der Membrantopologie (4.1.1), die als Grundlage und Ergänzung für eine experimentelle Topologiebestimmung (4.1.2) dienen können.

#### 4.1.1 *In silico* Topologievorhersage von DctA

Die Methode der *in silico* Topologiebestimmung beruht auf einer Berechnung der Anordnung von hydrophoben Aminosäuren und der Ladungsverteilung. Eine Transmembranhelix besteht aus mehreren aufeinanderfolgenden hydrophoben Aminosäuren. Bei der Berechnung von Transmembranhelices (TM) wird von einer je nach Algorithmus unterschiedlichen minimalen Länge der hydrophoben Aminosäuren ausgegangen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente war insbesondere die Lage der N- und C-Termini von Bedeutung.

Die Ergebnisse der *in silico* Topologiebestimmung von DctA aus *Escherichia coli* mit acht verschiedenen Algorithmen ist in Abb. 8 dargestellt. Es wurden je nach Algorithmus 8-10 TM vorhergesagt. Der N-Terminus befand sich bei allen Vorhersagen im Cytoplasma. Der C-Terminus lag bei fünf Vorhersagen im Cytoplasma, bei zweien jedoch im Periplasma. Die Vorhersagen zeigten eine für den Bereich von TM1 bis einschließlich TM6 einheitliche Topologie, C-terminal davon gab es starke Variationen. MEMSAT-SVM verfügte als einziger Algorithmus über die Berechnung von Haarnadelschleifen (HP), welche zwar in der Membran liegen, diese aber nicht überspannen. Für DctA wurden zwei HP vorhergesagt, eine vor und eine nach TM7. Bei allen anderen Algorithmen wurde die zweite Haarnadelschleife (HP2) als TM vorhergesagt.

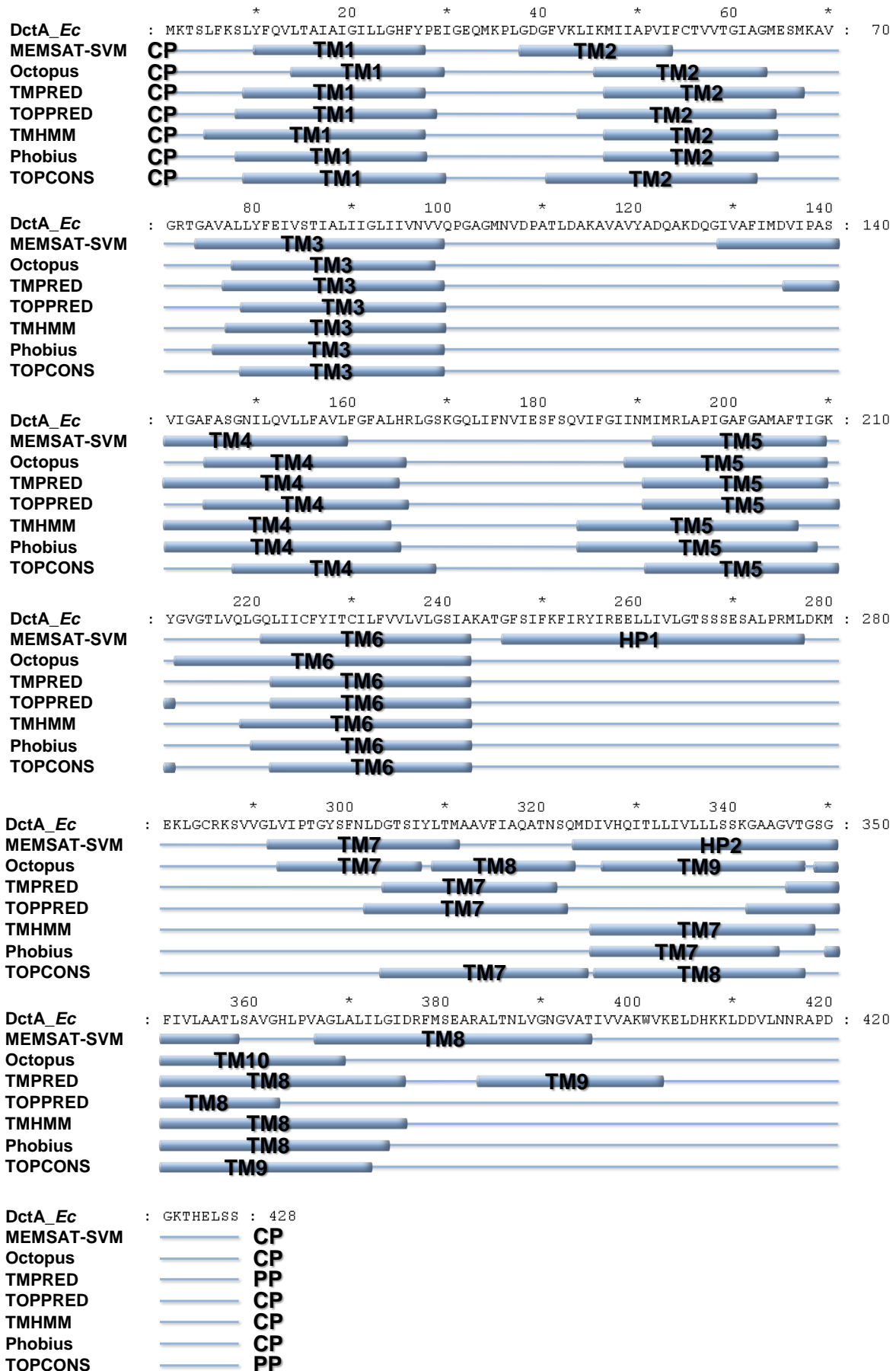


Abb. 8: **Vorhersage der DctA-Topologie durch *in silico* Analysen.** Vorhergesagte Transmembranhelices (TM) oder Haarnadelschleifen (HP) sind als blaue horizontale Balken markiert und beschriftet. Die vorhergesagte Lokalisation des N- und C-Terminus ist durch CP (Cytoplasma) oder PP (Periplasma) angegeben. DctA\_*Ec*: Aminosäuresequenz von DctA aus *E. coli*; Vorhersageprogramme: Memsat-SVM (Nugent, 2009), Octopus (Käll et al., 2004), TMPRED (Hofmann et al., 1993), TOPPED (Claros et al., 1994), TMHMM (Krogh et al., 2001), Phobius (Käll et al., 2007), TOPCONS (Bernsel et al., 2009).

#### 4.1.2 *In vivo* Topologiebestimmung von DctA mit PhoA- und LacZ-Fusionen

Die Topologiebestimmung mit PhoA- und LacZ-Fusionsproteinen basiert auf einer differentiellen Aktivität der alkalischen Phosphatase (PhoA) und der  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ). PhoA ist nur im Periplasma aktiv, während LacZ nur im Cytoplasma funktional ist. Das auf seine Topologie zu untersuchende Protein DctA wurde C-terminal sukzessiv verkürzt und jeweils als C-terminales PhoA- oder LacZ-Fusionsprotein exprimiert. Durch die komplementäre Aktivität von LacZ und PhoA ist eine hohe LacZ- und eine niedrige PhoA-Aktivität zu erwarten, wenn das Ende des verkürzten Fusionsproteins im Cytoplasma ist. Liegt das Ende des verkürzten Fusionsproteins jedoch im Periplasma, verhält es sich umgekehrt (niedrige PhoA- und hohe LacZ-Aktivität). Eine gleichmäßige Verteilung beider Aktivitäten deutet auf eine membranständige Lokalisation hin. 21 verschiedene C-terminale Verkürzungen sowie Volllängen-DctA wurden für eine umfassende Topologiebestimmung konstruiert. Die absoluten Aktivitätswerte in Miller Units dienten als Grundlage für die Berechnung der prozentualen Aktivität und des Verhältnisses von PhoA- zu LacZ-Aktivitäten (Tab. 15). Die höchste absolute LacZ-Aktivität wurde bei der Fusion mit V290, die höchste PhoA-Aktivität bei der Fusion mit M105 als letzter Aminosäure erreicht. Diese Werte wurden als 100 Prozent gesetzt und für die Berechnung der restlichen Aktivitäten verwendet. Das prozentuale Verhältnis von PhoA zu LacZ einer jeweiligen Fusion wurde errechnet und logarithmiert. Liegt der berechnete Wert über null, ist eine periplasmatische Lokalisation des C-Terminus anzunehmen, bei einem Wert kleiner null eine cytoplasmatische. Zusätzlich zu diesem PhoA/LacZ-Verhältnis wurde die Veränderung eines Wertes in Bezug auf den nächsten bei der Topologiebestimmung berücksichtigt. Ein alternierendes Auftreten von hohen LacZ- und PhoA-Aktivitäten entsprechend der Vorhersagen sprach für eine Membranintegration aller Konstrukte. Als Kontrolle wurde zusätzlich die Membranintegration des kürzesten Konstrukts DctA<sub>1-P28</sub>-PhoA mit Hilfe einer Saccharosegradientenultrazentrifugation nachgewiesen (vgl S. 128).

Tab. 15: **Absolute und relative PhoA- und LacZ-Aktivitäten von C-terminal verkürzten DctA-Fusionsproteinen.** Die letzte C-terminale Aminosäure des verkürzten Proteins DctA ist durch den Einbuchstabencode gefolgt von ihrer Position angegeben. Bei den Aktivitäten ist die absolute Aktivität in Miller Units (MU) dargestellt. Die prozentuale Aktivität (%) errechnet sich aus der absoluten Aktivität geteilt durch die maximal erreichte Aktivität. Der dekadische Logarithmus  $\log_{10}$  gibt Auskunft über die Lokalisierung des C-Terminus. Ein Wert kleiner als 0 (größer als 0) spricht für eine cytoplasmatische (periplasmatische) Lokalisation.

Position des C-Terminus	LacZ-Aktivität		PhoA-Aktivität		$\log_{10} \frac{\% \text{ PhoA}}{\% \text{ LacZ}}$
	(MU)	(%)	(MU)	(%)	
P28	12±5	5	53±7	64	1,106
E65	56±19	68	37±7	45	-0,175
<b>M105</b>	<b>11±9</b>	<b>5</b>	<b>82±8</b>	<b>100</b>	<b>1,307</b>
A131	13±7	6	53±8	64	1,047
K170	157±22	68	2±2	2	-1,465
S180	170±23	74	4±3	5	-1,213
I208	70±15	31	60±5	73	0,378
T215	88±9	38	54±17	66	0,235
I242	55±9	24	56±6	69	0,454
F250	103±6	45	27±9	33	-0,128
E270	163±15	71	2±1	2	-1,571
<b>V290</b>	<b>230±25</b>	<b>100</b>	<b>3±1</b>	<b>3</b>	<b>-1,465</b>
F300	222±23	97	3±1	4	-1,435
Q323	124±19	54	11±7	13	-0,608
S340	115±10	50	6±1	7	-0,835
G350	176±17	76	8±6	10	-0,894
P365	41±3	18	56±14	68	0,582
L373	123±8	53	27±5	33	-0,209
S380	99±11	43	54±17	66	0,188
G390	172±19	75	12±2	15	-0,709
K403	184±13	80	13±1	16	-0,704
S428	210±16	91	16±4	19	-0,680

Die prozentualen Aktivitäten und die Veränderungen der LacZ- verglichen mit den PhoA- Werten werden am besten durch eine direkte Gegenüberstellung sichtbar (Abb. 9). DctA von Aminosäure 1 bis P28 hatte eine hohe PhoA- und eine geringe LacZ-Aktivität und lag somit in Übereinstimmung mit den Vorhersagen (Abb. 8) im Periplasma. Die nächstlängere Fusion bis zu Aminosäure E65 zeigte hingegen eine geringere PhoA-Aktivität als P28 und zusätzlich eine stark erhöhte LacZ-Aktivität. Daraus ließ sich eine, wieder mit den Vorhersagen übereinstimmende, cytoplasmatische Lokalisation ableiten. Die Vorhersagen stimmten mit den experimentellen Ergebnissen auch bei den anschließenden Fusionen bis einschließlich F300 sehr gut überein. Alle Vorhersagen schlugen mindestens eine TM im Bereich zwischen F300 und G350 vor. Experimente mit Fusionsproteinen zeigten in diesem Bereich jedoch keinen deutlichen Wechsel der PhoA- und LacZ-Aktivitäten.



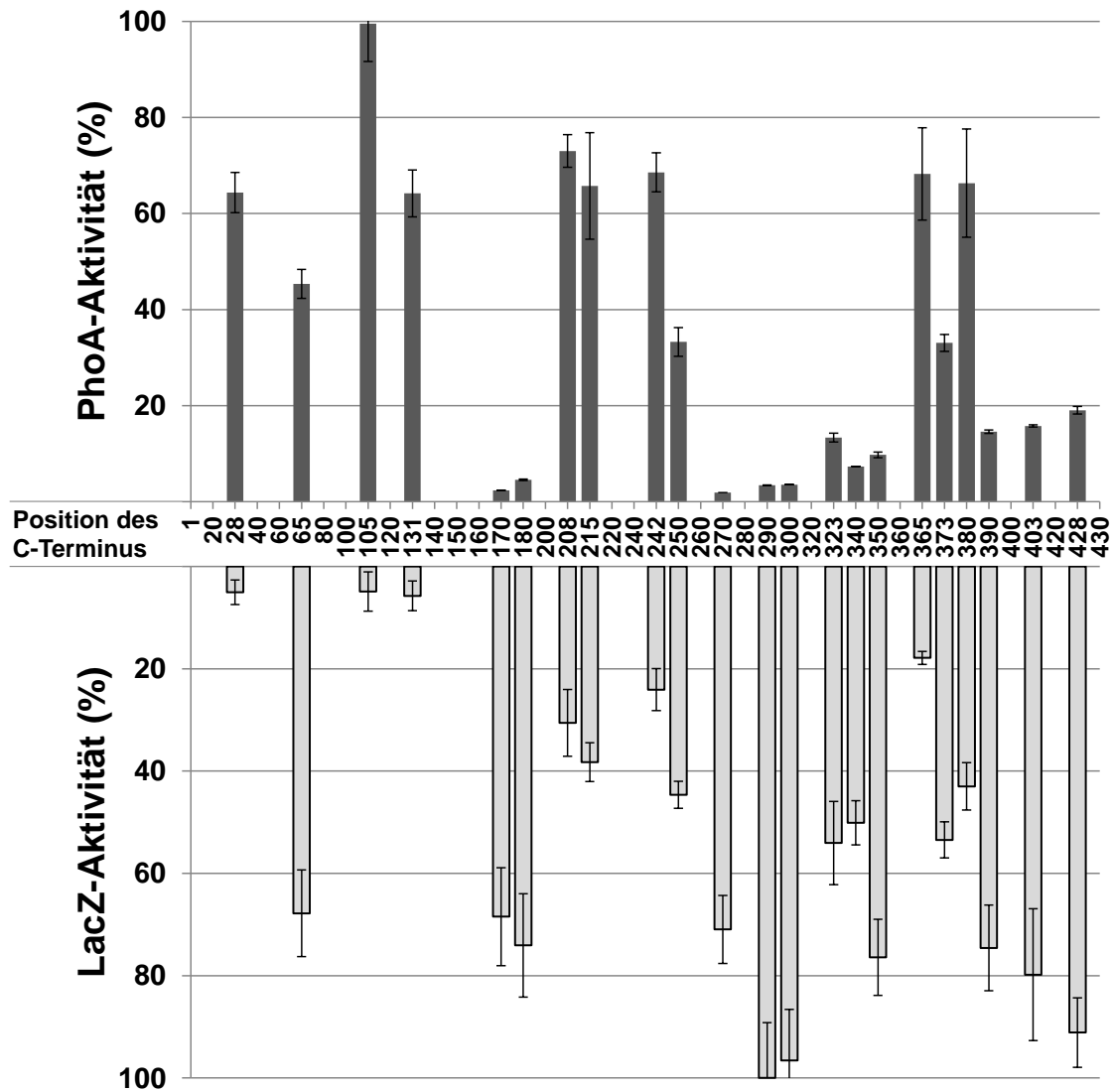


Abb. 9: **Prozentuale PhoA- und LacZ-Aktivitäten einer Serie C-terminal verkürzter DctA-Fusionsproteine.** Dargestellt ist die Aktivität der Fusion in Prozent des maximal erreichten Wertes (Tab. 15). Der Maximalwert für PhoA ist an Position M105 (82 MU) und der höchste Wert für LacZ ist an Position V290 (230 MU). Die Position des C-terminalen Rests der jeweiligen Fusion von DctA ist auf der X-Achse dargestellt.

Erst mit den Fusionen P365 und S380 stieg die PhoA-Aktivität wieder, um in erneutem Wechsel ab G390 hohe LacZ- und geringe PhoA-Aktivität zu erreichen. Somit unterstützen die Experimente die mehrheitlich vorhergesagte cytosolische Lokalisation des C-Terminus.

In einer anderen Darstellungsweise wurde der dekadische Logarithmus der Verhältnisse des jeweiligen Konstrukts von Prozent PhoA geteilt durch Prozent LacZ aufgetragen. In dieser Abbildung war die Lage der TM durch alternierende PhoA- und LacZ-Aktivitäten zu erkennen (Abb. 10). Die Übergänge der PhoA- und LacZ-Aktivitäten stimmten bis einschließlich der Transmembranhelix 6 (TM6) exakt mit den Vorhersagen überein. Auch an

Position Q323 ist eine Veränderung der Verhältnisse zu erkennen, die stark für eine TM spricht; allerdings wurde für  $\log_{10}(\text{PhoA/LacZ})$  kein positiver Wert ermittelt. Auch die folgenden Fusionen lieferten kein mit den Vorhersagen übereinstimmendes eindeutiges Bild bis zur Transmembranhelix 8 (TM8) an Position S380. Die Lage der durch MEMSAT-SVM vorhergesagten Haarnadelschleifen 1 und 2 (HP1, HP2) wurde ebenfalls eingetragen. HP1 befand sich in einer Region mit experimentell bestimmter cytosolischer Lokalisation. HP2 lag in einer Region mit experimentell nicht eindeutig belegbarer Aussage.

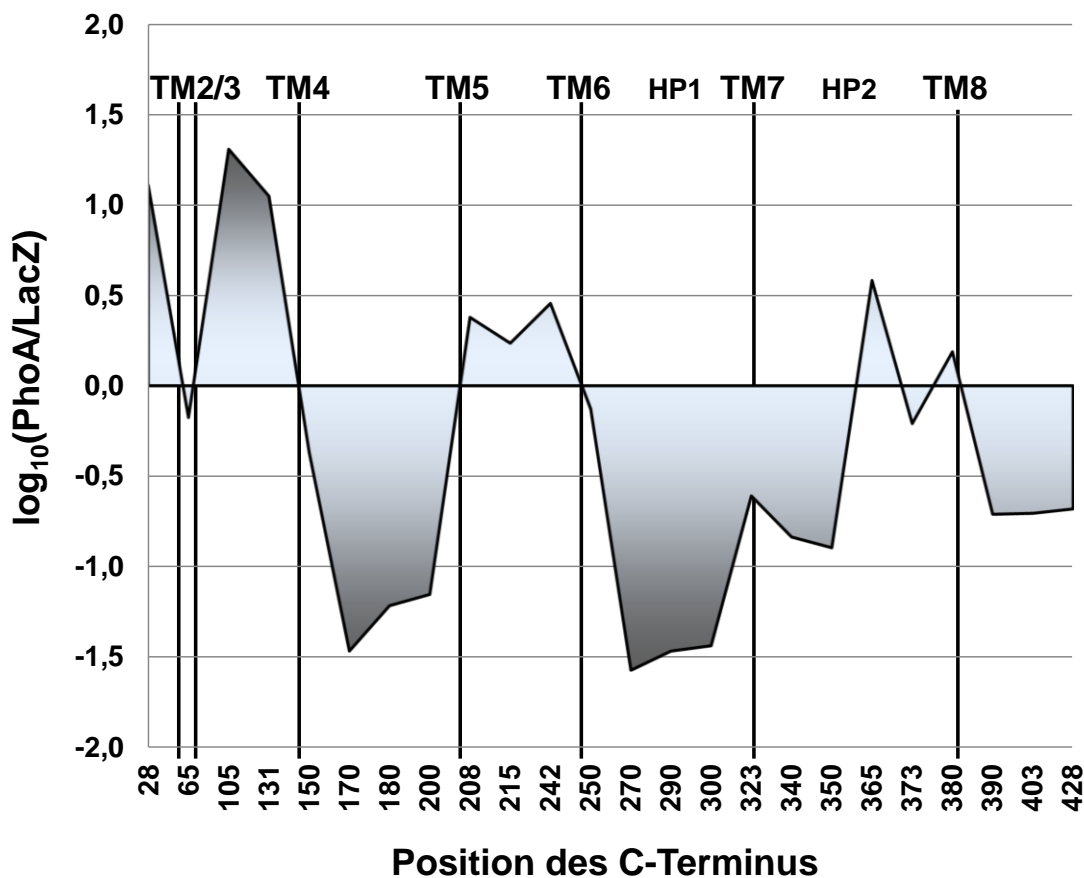


Abb. 10: Verhältnis von PhoA- zu LacZ-Aktivitäten einer Serie C-terminal verkürzter DctA-Fusionsproteine. Der Verlauf der PhoA/LacZ-Aktivität wurde als dekadischer Logarithmus der Aktivitäten in Prozent aufgetragen (Tab. 15). Die Position des C-terminalen Endes von DctA ist auf der X-Achse dargestellt. Durch *in silico* Analysen vorhergesagte Transmembranhelices (TM) und Haarnadelschleifen (HP) sind angegeben.

## 4.1.3 Vergleichende Analyse zwischen DctA und homologen Proteinen

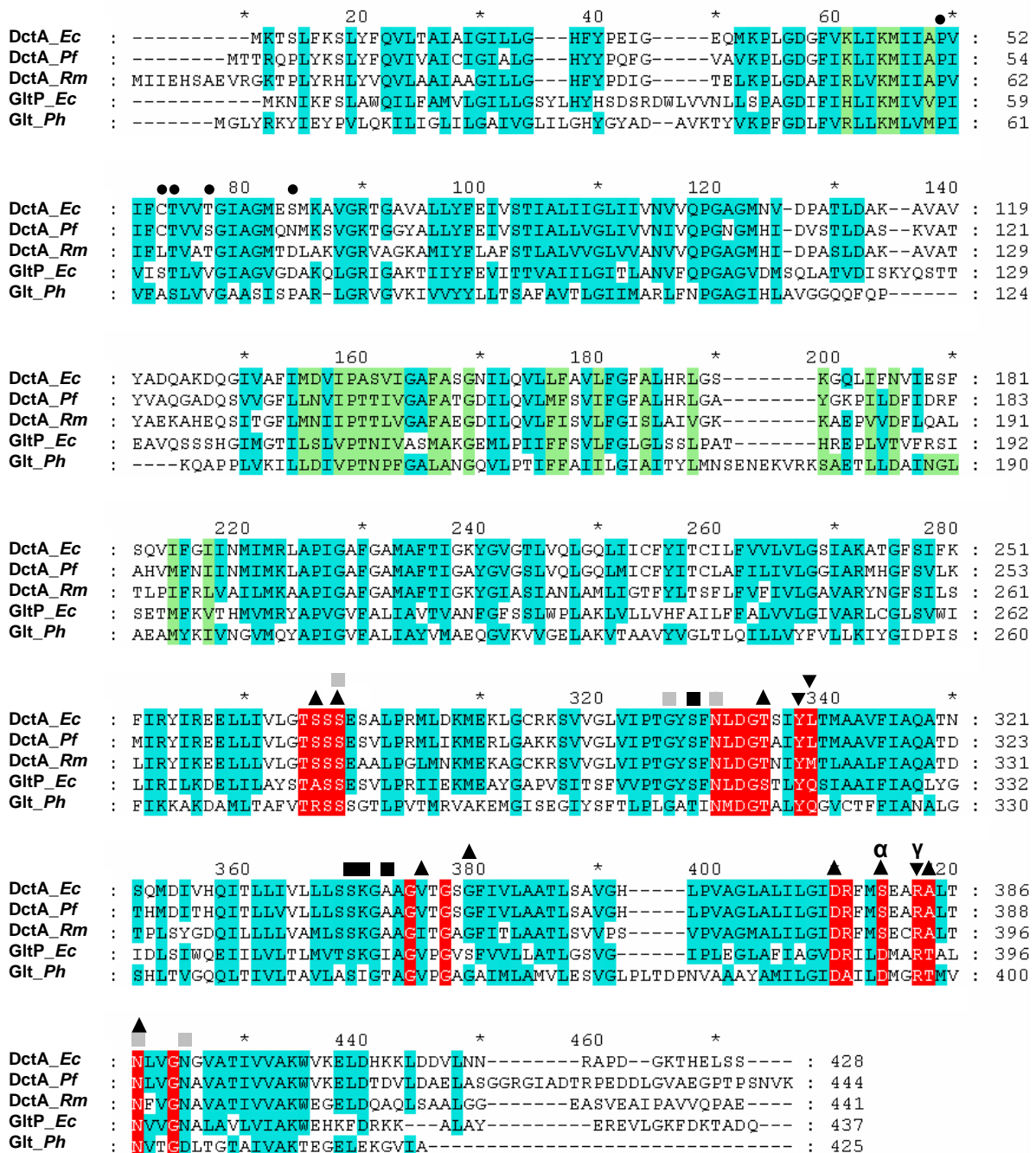
DctA aus *Escherichia coli* (DctA\_Ec) gehört zur DAACS-Transporterfamilie (dicarboxylate amino acid:cation symporter). Zu dieser Familie gehören auch DctA-Transporter aus *Pseudomonas fluorescens* (DctA\_Pf) und *Rhizobium meliloti* (DctA\_Rm). Ebenso dazu gezählt werden die Glutamat- und Aspartat-Transporter GltP aus *Escherichia coli* (GltP\_Ec) und Glt aus *Pyrococcus horikoshii* (Glt\_Ph). In Tab. 16 sind die Sequenzidentitäten dieser Proteine in % gegeneinander aufgetragen. DctA\_Ec besitzt die größten Übereinstimmungen mit DctA\_Pf und DctA\_Rm mit 73 bzw. 60 Prozent. Mit GltP\_Ec hat DctA\_Ec 37 und zu Glt\_Ph 26 % Identität. Diese Sequenzähnlichkeit ist deshalb interessant, weil Glt\_Ph einer der wenigen Transporter mit experimentell bestimmter 3D-Struktur ist (Yernool et al., 2004). Glt\_Ph wurde mit und ohne Substrat kristallisiert und der Transportmechanismus wurde intensiv untersucht (Yernool et al., 2004; Boudker et al., 2007; Crisman et al., 2009; Reyes et al., 2009). Obwohl die Identität mit 26 Prozent relativ gering ist, konnten Rückschlüsse von Glt\_Ph auf DctA\_Ec gemacht werden, da die Sekundärstrukturen von Transmembranproteinen besser konserviert sind als ihre Aminosäuresequenzen.

Tab. 16: **Sequenzähnlichkeit von DctA aus *Escherichia coli* (DctA\_Ec), *Pseudomonas fluorescens* (DctA\_Pf), *Rhizobium meliloti* (DctA\_Rm), GltP aus *Escherichia coli* (GltP\_Ec) und Glt aus *Pyrococcus horikoshii* (Glt\_Ph) in Prozent Aminosäureidentität.** Die Sequenzen wurden paarweise mit ClustalW2 (Larkin et al., 2007) verglichen und die Identität auf Aminosäureebene bestimmt. DctA ist ein Transporter für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate, GltP\_Ec und Glt\_Ph transportieren Glutamat und Aspartat.

	DctA_Ec	DctA_Pf	DctA_Rm	GltP_Ec
DctA_Ec	100	-	-	-
DctA_Pf	73	100	-	-
DctA_Rm	60	58	100	-
GltP_Ec	37	37	36	100
Glt_Ph	26	29	29	33

Ein ausführlicher Sequenzvergleich von fünf Mitgliedern der DAACS-Transporterfamilie ist in Abb. 11 dargestellt. Die laut Sequenzvergleich strukturell ähnlichen oder identischen Aminosäurereste wurden blau unterlegt. Die Konservierung ist relativ gleichmäßig über die gesamte Proteinlänge verteilt. Grün hinterlegt sind Aminosäuren, die laut Yernool et al. (2004) einen Trimerisierungskontakt in Glt\_Ph darstellten sowie deren entsprechend konservierte Aminosäuren aus anderen Transportern. In Glt\_Ph am Glutamattransport

beteiligte Aminosäuren (Yernool et al., 2004) sind rot hinterlegt. Die Bindestellen der  $\alpha$ -Aminogruppe und der  $\gamma$ -Carboxylgruppe sind durch entsprechende Symbole ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ) markiert. 14 von 20 der direkt oder indirekt an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren waren in allen fünf Transportern identisch. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass die Substratbindung in allen diesen Transportern ebenfalls ähnlich erfolgt. Besonders auffallend war die Position der  $\alpha$ -Aminogruppenbindestelle von Glutamat.



**ClustalW:**

■ = Sequenzähnlichkeit

**Glt<sub>Ph</sub> Kristallstruktur**

Yernool et al. 2004:

■ = Trimerisierungskontakt

■ = an Glutamat Transport beteiligt

γ = Bindestelle der γ-Carboxylat-  
gruppe von Glutamatα = Bindestelle der α-Aminogruppe  
von Glutamat● = K<sup>+</sup>-Kopplung▲ = Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit

Boudker et al. 2007:

■ = Na<sup>+</sup>-Bindestelle 1■ = Na<sup>+</sup>-Bindestelle 2

▼ = Aspartat-Bindestelle

Abb. 11: Sequenzvergleich von DctA aus *Escherichia coli* (DctA<sub>Ec</sub>), *Pseudomonas fluorescens* (DctA<sub>Pf</sub>), *Rhizobium meliloti* (DctA<sub>Rm</sub>), GltP aus *Escherichia coli* (GltP<sub>Ec</sub>) und Glt aus *Pyrococcus horikoshii* (Glt<sub>Ph</sub>). Sequenzähnlichkeiten laut ClustalW2 Sequenzvergleich (Larkin et al., 2007) sind blau unterlegt. Eigenschaften, die in Glt<sub>Ph</sub> durch die Analyse von Kristallstrukturen (Yernool et al., 2004; Boudker et al., 2007) gefunden wurden, sind wie in der Legende vermerkt markiert.

Bei den Aminosäuretransportern GltP<sub>Ec</sub> und Glt<sub>Ph</sub> bindet ein negativ geladener Aspartatrest die positiv geladene α-Aminogruppe des Glutamats. Bei den C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transportern DctA<sub>Ec</sub>, DctA<sub>Pf</sub> und DctA<sub>Rm</sub>, die Substrate ohne α-Aminogruppe transportieren, ist der Aspartatrest durch ein Serin ersetzt. Die direkt am Transport von Aspartat durch Glt<sub>Ph</sub> beteiligten Aminosäuren wurden identifiziert und stimmten mit den Glutamat bindenden Resten überein (Boudker et al., 2007).

Alle Transporter der DAACS-Familie nehmen ihr Substrat im Symport mit Kationen auf. Man kann zwischen dem Transport von H<sup>+</sup> und Na<sup>+</sup> unterscheiden, wobei auch der Co-Transport von H<sup>+</sup> und Na<sup>+</sup> bekannt ist (Slotboom et al., 1999). Glt<sub>Ph</sub> betreibt einen Co-Symport von Aspartat oder Glutamat mit zwei Na<sup>+</sup>-Ionen (Boudker et al., 2007). Die Bindestellen der Na<sup>+</sup>-Ionen konnten identifiziert werden. Von fünf koordinativen Aminosäureresten der Na<sup>+</sup>-Bindestelle 1 sind vier der in Abb. 11 verglichenen Transporter identisch. Im Gegensatz dazu ist nur eine Aminosäure der Na<sup>+</sup>-Bindestelle 2 komplett konserviert. Möglicherweise wird also auch in den DctA-Homologen mindestens ein Na<sup>+</sup> co-transloziert, obwohl ein Symport mit 2-3 H<sup>+</sup> pro Molekül Succinat beschrieben wurde (Gutowski und Rosenberg, 1975; Slotboom et al., 1999).

Um bessere Rückschlüsse auf die Strukturverwandtschaft von DctA<sub>Ec</sub> mit Glt<sub>Ph</sub> zu erhalten, wurde ein Sequenzvergleich von DctA<sub>Ec</sub> mit Glt<sub>Ph</sub> durch CLUSTALW2 erstellt (Abb. 12).

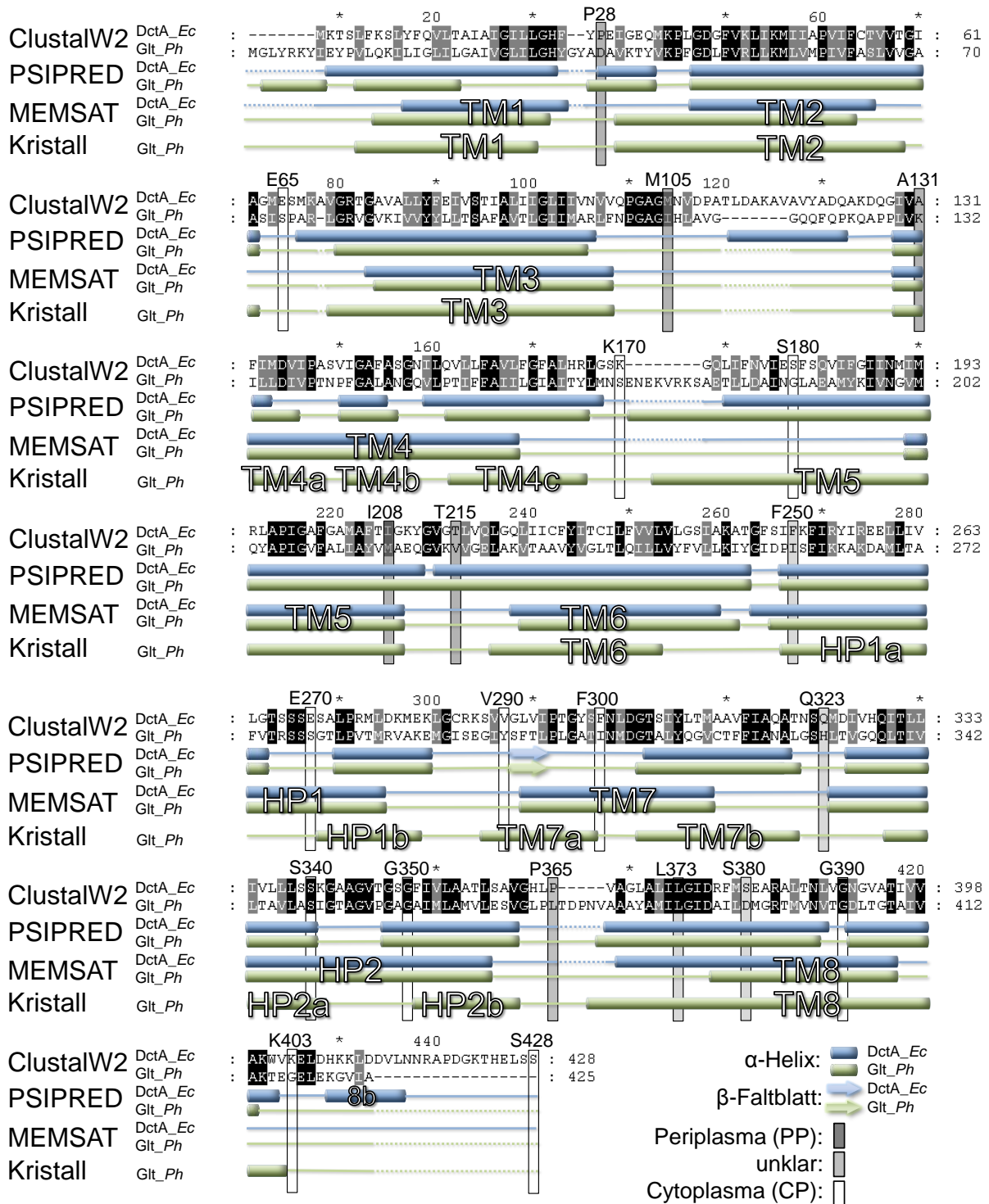


Abb. 12: Vergleich der Sequenzen, der Sekundärstrukturen und der Topologie von DctA aus *Escherichia coli* (DctA\_Ec) und Glt aus *Pyrococcus horikoshii* (Glt\_Ph). Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW2 (Larkin et al., 2007) erstellt. Identische Reste sind mit schwarzen Kästchen, strukturell ähnliche Aminosäuren mit grauen Kästchen hinterlegt. Die Sekundärstrukturen von DctA\_Ec und Glt\_Ph wurden mit PSIPRED (Jones, 1999) und MEMSAT-SVM (Nugent, 2009) vorhergesagt oder der Glt\_Ph-Kristallstruktur entnommen (Yernool et al., 2004). α-Helices sind als horizontale Balken (DctA\_Ec blau, Glt\_Ph grün) und β-Faltblätter als Pfeile (DctA\_Ec blau, Glt\_Ph grün) dargestellt. Die experimentell bestimmte Lokalisation einzelner C-terminal verkürzter DctA\_Ec Proteine ist mit vertikalen Balken und Aminosäureposition angegeben.



aufgrund der experimentellen Befunde mit PhoA- und LacZ-Fusionen sowie durch Vergleiche mit Glt\_*Ph* erstellt. DctA\_*Ec* besitzt demnach acht TM und zwei HP. Beide HP und TM7 plus TM8 bilden vermutlich die Substratbindetasche von DctA\_*Ec*, ähnlich wie in Glt\_*Ph*. Beide Termini befinden sich im Cytoplasma. Als einzige zusätzliche  $\alpha$ -helikale Bereiche sind die orange markierten vorhergesagten Helices zu erwähnen.

#### 4.1.4 3D-Strukturmodell-Vorhersage für DctA

Die Aminosäureidentität von DctA zu Glt\_*Ph* beträgt nur 26 Prozent, aber die Sekundärstrukturvorhersagen für beide Proteine waren sehr ähnlich. Diese Gemeinsamkeiten reichten aus, um ein 3D-Strukturmodell für DctA (Abb. 14) auf Basis von Glt\_*Ph* (Abb. 15) zu erstellen. Das Modell von DctA wurde über den Server SWISS-MODEL (Arnold et al. 2006) auf Grundlage von Glt\_*Ph* mit gebundenem Aspartat (Proteindatenbankeintrag 2NWX) erstellt. Die Struktur ist in einem Farbverlauf von blau (N-Terminus) über grün und gelb bis rot (C-Terminus) dargestellt.

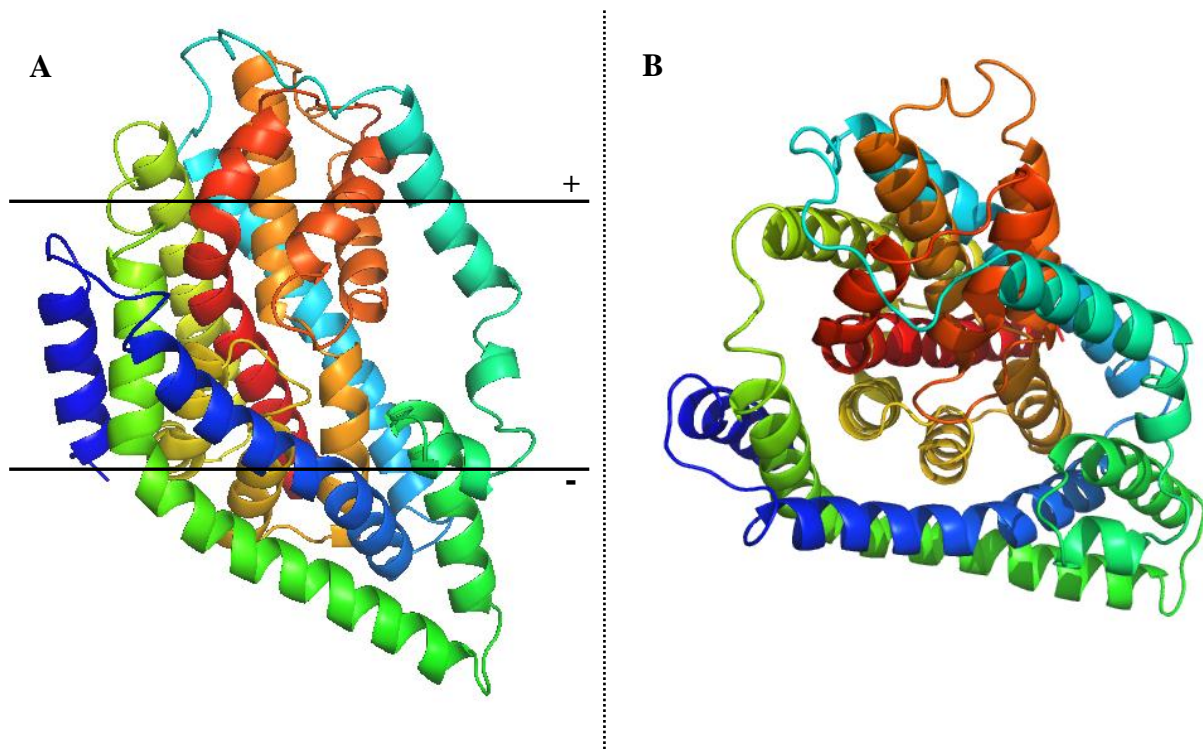


Abb. 14: **3D-Strukturvorhersage für DctA\_*Ec* basierend auf Glt\_*Ph* (PDB Eintrag: 2NWX).** Die Vorhersage erfolgte durch SWISS-MODEL (Arnold et al. 2006) und erstreckt sich über die DctA Aminosäuren 10-402. Gezeigt sind Seitenansicht (A) und Sicht aus dem Periplasma (B). Die Färbung verläuft von blau (N-Terminus) über grün, gelb bis rot (C-Terminus).



In den Abb. 14A und Abb. 15A ist eine Seitenansicht dargestellt, in den Abb. 14B und Abb. 15B eine Aufsicht aus dem Periplasma.

Der N- und C-terminale cytosolische Teil von Glt\_*Ph* waren zu flexibel, störten die Kristallisation und wurden deshalb abgeschnitten (Yernool et al., 2004). Somit fehlt auch die Vorhersage der homologen Bereiche in DctA, vor allem eine Vorhersage der Aminosäuren 1-9 und 403-428. Generell ist das DctA-Modell sehr ähnlich zu dem von Glt\_*Ph*. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass ein 3D-Modell aufgrund einer anderen kristallisierten Struktur in dem Bereich von nur 26 Prozent Aminosäureidentität lediglich unterstützend dienen kann. In Bereichen mit höherer Identität wie der Substratbindetasche (70 % Identität) ist eine ähnliche Struktur wesentlich wahrscheinlicher als in weniger ähnlichen Bereichen. Eine Übersicht der Qualität des Modells ist im Anhang zu finden (Abb. A1).

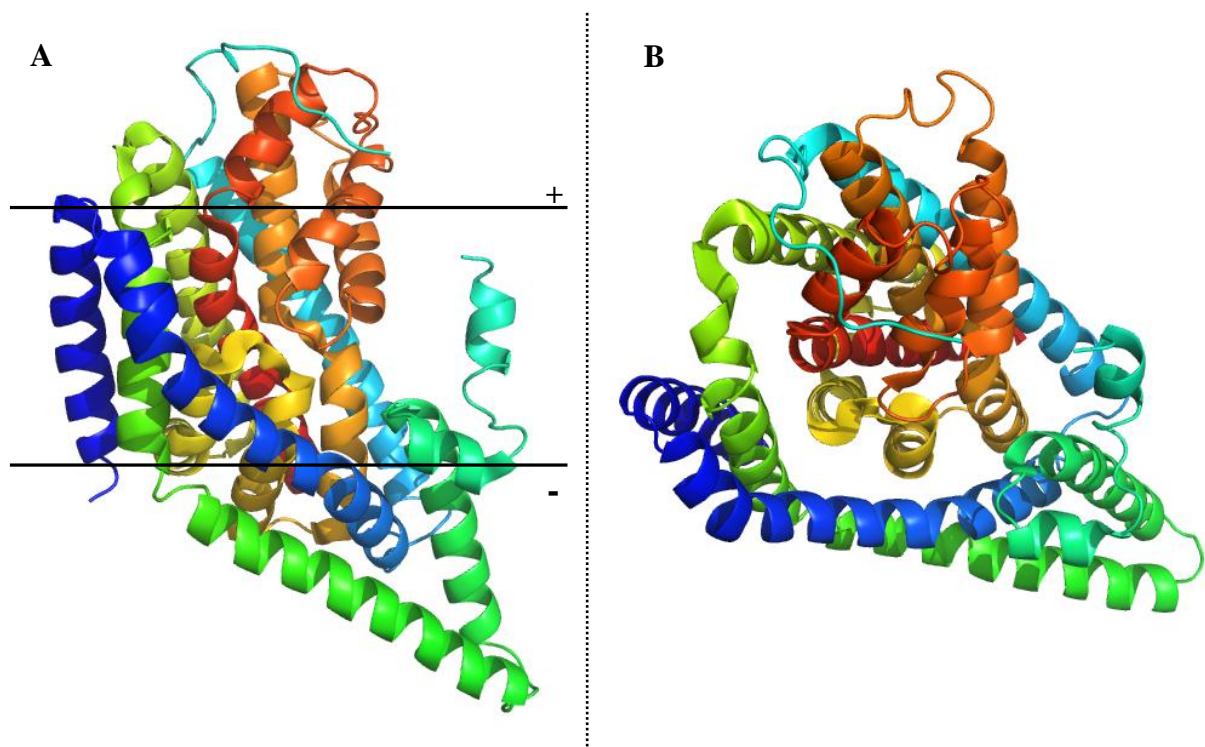


Abb. 15: **Kristallstruktur eines Glt\_*Ph* Monomers.** Dargestellt ist die Kristallstruktur von Glt\_*Ph* (PDB Eintrag: 2NWX, in Komplex mit Aspartat und Natrium, nicht gezeigt) in Seitenansicht (A) und aus Sicht des Periplasmas (B). Die Färbung verläuft von blau (N-Terminus) über grün, gelb bis rot (C-Terminus).

## 4.2 Genexpression und Funktion von *dctA*

### 4.2.1 DcuB und DctA als anaerobe und aerobe Co-Sensoren von DcuS

Die Gene *dctA* und *dcuB* kodieren beide für C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter. Ihre Expression wird durch das DcuSR System reguliert. Deletion von DcuSR führt zu einer Inaktivierung der *dctA*- und *dcuB*-Genexpression (Golby et al., 1999; Zientz et al., 1998). *DctA* wird aerob in der stationären Phase bei Zucht mit C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten verstärkt exprimiert (Davies et al., 1999). *DcuB* wird anaerob bei Zucht auf C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten exprimiert und spielt aerob keine Rolle (Zientz et al., 1998; Six et al., 1994).

Bei aerober Zucht in angereichertem M9 Medium mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle war die Expression von *dctA*, gemessen durch *dctA-lacZ* Reporterfusionen im Wildtypstamm (Wt, IMW385), sehr niedrig (Abb. 16A). Sie konnte durch Zusatz von Fumarat gesteigert werden. Inaktivierung von DctA führte zu einer fast konstitutiven Aktivität des *dctA*-Promotors. Bei aerober Zucht mit Fumarat ohne Glycerin ließ sich die *dctA-lacZ* Aktivität noch erheblich steigern (vgl. Abb. 56). Die chromosomale Inaktivierung von *dcuB* wirkte sich aerob nicht auf die regulatorische Aktivität von DcuSR aus. *DctA-lacZ* Messungen einer *dcuB*-Mutante (DcuB<sup>-</sup>, IMW539) besaßen dementsprechend in Übereinstimmung mit früheren Messungen ein wildtypisches Muster (Abb. 16A, Kleefeld et al., 2009).

Die Expression des anaeroben Transporters DcuB wurde in dem wildtypischen *E. coli* Stamm (Wt, IMW237) bei anaerobem Wachstum durch C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren induziert (Abb. 16B; Kleefeld et al., 2009). Ohne C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren war kaum Expression zu messen. Inaktivierung von *dcuB* führte zu einer fast konstitutiven Aktivität des *dcuB*-Promotors, gemessen durch *dcuB-lacZ* (Abb. 16B). Eine Inaktivierung von *dctA* wirkte sich anaerob nicht auf die regulatorische Aktivität von DcuSR aus, *dcuB-lacZ* Messungen einer *dctA*-Mutante besaßen dementsprechend ein wildtypisches Muster. Diese Beobachtungen führten zu der Theorie, dass DctA aerob und DcuB anaerob Co-Sensoren von DcuS sind.

Wenn DctA und DcuB tatsächlich Co-Sensoren von DcuS sind, sollte plasmidkodiertes DctA oder DcuB die Regulation einer chromosomalen Deletion von DctA oder DcuB komplementieren können. Um das zu untersuchen, wurden verschiedene DctA- und DcuB-kodierende Plasmide erstellt und in *dctA*- bzw. *dcuB*-Deletionsstämmen exprimiert.

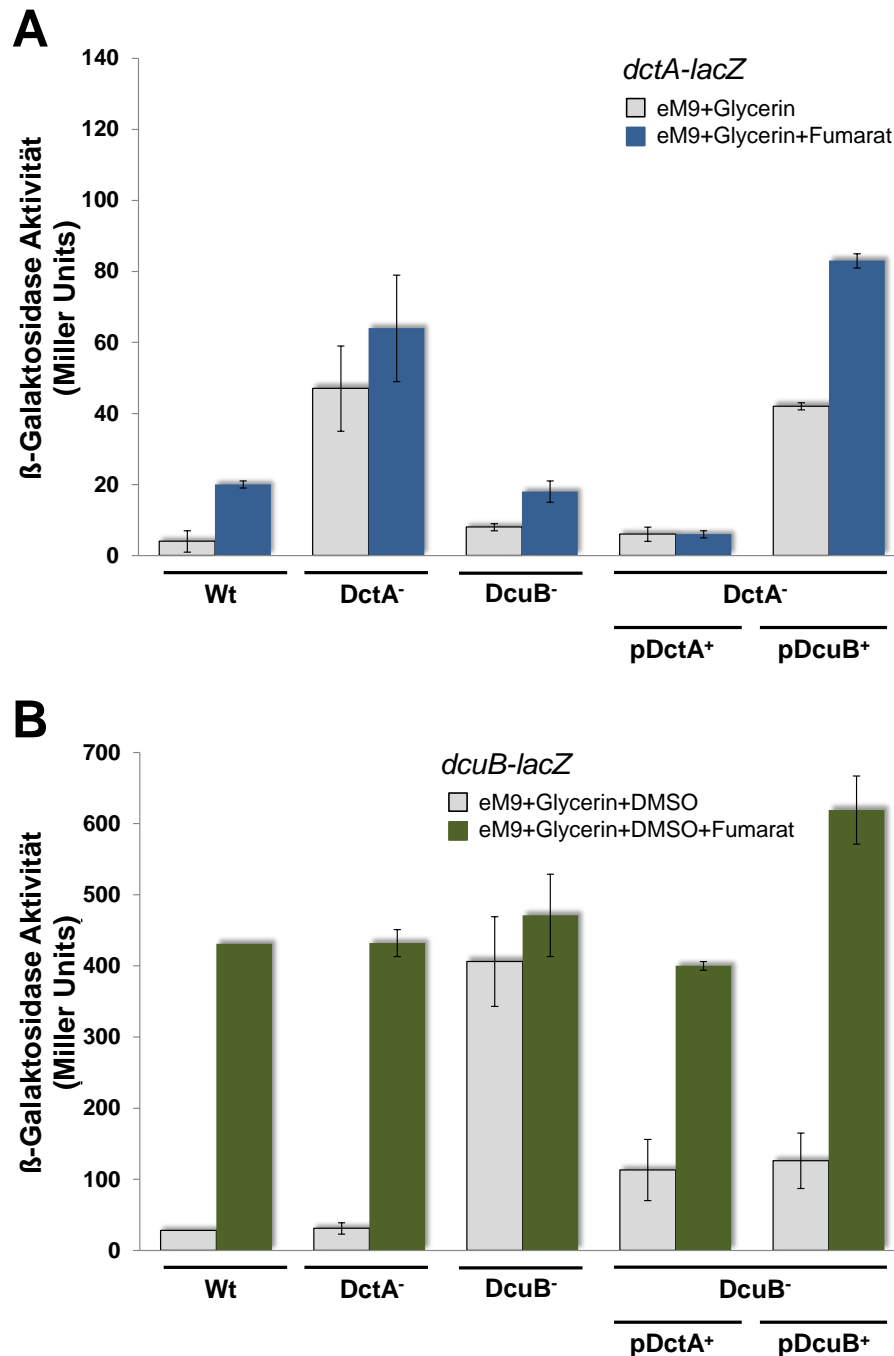


Abb. 16: Einfluss von DctA und DcuB auf die Genexpression von (A) *dctA-lacZ* und (B) *dcuB-lacZ*. (A) Messung erfolgte nach aerober Zucht in eM9 plus Glycerin mit (blau) oder ohne (grau) Fumarat mit dem Wildtyp (Wt, IMW385), dem DcuB-negativen Stamm (DcuB<sup>-</sup>, IMW539) und der DctA-negativen Mutante (DctA<sup>-</sup>, IMW386). Plasmidkodiertes DctA (pDctA<sup>+</sup>, pMW457) oder plasmidkodiertes DcuB (pDcuB<sup>+</sup>, pMW619) wurden exprimiert, um die DctA-Deletion zu komplementieren. (B) Messung erfolgte nach anaerober Zucht in eM9 plus Glycerin und DMSO mit (grün) oder ohne (grau) Fumarat mit dem Wildtyp (Wt, IMW237), dem DctA-negativen Stamm (DctA<sup>-</sup>, IMW398) und der DcuB-negativen Mutante (DcuB<sup>-</sup>, IMW505). Plasmidkodiertes DctA (pDctA<sup>+</sup>, pMW1194) oder plasmidkodiertes DcuB (pDcuB<sup>+</sup>, pMW619) wurden exprimiert, um die DcuB-Deletion zu komplementieren.

Komplementation der DctA-Deletion unter aeroben Bedingungen erfolgte durch ein in den pET28a-Vektor kloniertes *dctA*-Gen mit natürlicher Promotorregion. In wildtypischer Form zeigte dieses Plasmid bei Zucht auf Glycerin und Glycerin plus Fumarat nur eine schwache *dctA-lacZ* Expression, also weder den regulatorischen Phänotyp des Wildtyps noch den der chromosomal inaktivierten *dctA*-Mutante (Abb. 16A). Möglicherweise führte die Überexpression von DctA zu diesem unerwarteten Effekt, indem es das chromosomal exprimierte DcuS band und somit die eigene Expression reprimierte. Das Plasmid war funktional in der Wachstumskomplementation einer DctA-negativen Mutante (Bauer, 2010).

Alternativ wurde versucht, die Funktion von DcuS in einem DctA-negativen Stamm mit plasmidkodiertem DcuB zu komplementieren. Hierzu wurde das künstlich induzierbare Plasmid pMW619 verwendet, da DcuB unter aeroben Bedingungen im Wildtyp nicht exprimiert wird. Die aerobe Komplementation einer DctA-negativen Mutante durch DcuB war nicht erfolgreich (Abb. 16A). Die *dctA-lacZ* Aktivität entsprach mit und ohne Fumarat der Aktivität der DctA-negativen Mutante. Auch verschiedene Expressionsstärken der Plasmide führten zu keiner Komplementation (Abb. A3). Versuche zeigten, dass das verwendete DcuB-Plasmid eine chromosomale DcuB-Deletion anaerob größtenteils komplementieren konnte und somit anaerob funktional war (Abb. 16B; Abb. A2). Das aerobe Wachstum einer DctA-negativen Mutante mit Fumarat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle konnte nicht durch den Fumarat/Succinat Antiporter DcuB komplementiert werden (Abb. A4). Um zu überprüfen, ob die aerobe Expression von DcuB zu einer Wachstumshemmung führt, wurde eine Wachstumskontrolle mit Glycerin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle durchgeführt. Sie zeigte, dass erst die Induktion der Plasmide durch 500  $\mu$ M L-Arabinose zu einer Wachstumshemmung führte. Diese Wachstumshemmung beruht damit auf der Zugabe von Arabinose, da mit Glycerin als Kohlenstoff- und Energiequelle kein DctA oder DcuB benötigt werden (Abb. A5).

Um zu testen, ob DctA unter anaeroben Bedingungen die regulatorische Funktion von DcuB übernehmen kann, wurden *dcuB-lacZ* Messungen in einem DcuB-negativen Stamm unter anaeroben Zuchtbedingungen durchgeführt. In diesem Stamm wurde DctA künstlich durch ein induzierbares Plasmid exprimiert. Die Zucht erfolgte anaerob auf eM9 + Glycerin + DMSO, mit oder ohne Fumarat als zusätzlichem Elektronenakzeptor. In einem Wildtypstamm mit *dcuB-lacZ*-Fusion ließ sich die Expression von *dcuB-lacZ* durch Fumarat um den Faktor 14 steigern (Abb. 16B). In einem durch DctA komplementierten DcuB-negativen Stamm betrug der Unterschied zwischen Kulturen mit und ohne Fumarat Faktor 3,5. Im DcuB-

negativen, durch ein DcuB-Plasmid komplementierten Stamm war dieser Faktor 4,9. Die absoluten *dcuB-lacZ* Werte der DctA- und DcuB-komplementierten Stämme waren um 75 % geringer als der entsprechende Wert der unkomplementierten DcuB-negativen Mutante. Sowohl plasmidkodiertes DctA als auch DcuB konnten die regulatorische Funktion von DcuB nach künstlich induzierter Expression unter anaeroben Bedingungen übernehmen.

#### 4.2.2 Modell für die Regulation der Zielgene von DcuS durch Protein-Protein-Interaktion mit den Co-Sensoren DcuB und DctA

Offensichtlich spielen DctA aerob und DcuB anaerob eine wichtige Rolle in der Regulation der DcuSR-Zielgene, unter anderem in der Expression von *dctA* oder *dcuB*. In Abb. 17 ist ein Modell für die Regulation von DcuSR durch DctA dargestellt; es gilt analog auch unter anaeroben Bedingungen für DcuB (nicht dargestellt). Die Expression von *dctA* wird durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen DcuS und DctA reguliert. Sind keine C<sub>4</sub>-Dicarboxylate vorhanden, interagiert DctA mit DcuS. DctA hemmt dann die Kinaseaktivität von DcuS, wodurch weniger DcuS und DcuR phosphoryliert werden (Abb. 17A).

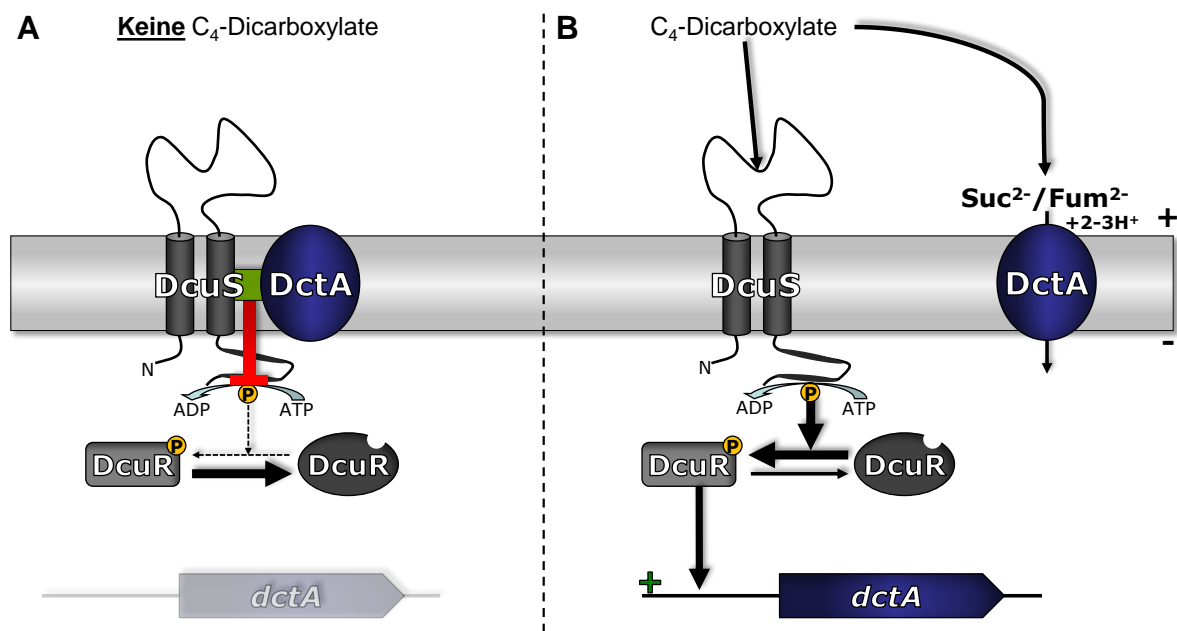


Abb. 17: **Regulationsmodell der Zielgene von DcuS durch DctA unter aeroben Bedingungen durch die Abwesenheit (A) oder das Vorhandensein (B) von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten.** Unter anaeroben Bedingungen übernimmt DcuB die Co-Sensorfunktion von DctA (nicht gezeigt).

Diese Protein-Protein-Interaktion zwischen DctA und DcuS wird modifiziert oder geht verloren, sobald C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren vorhanden sind und DctA transportaktiv ist. Zusätzlich binden C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren an die periplasmatische PAS-Domäne von DcuS. Die phosphorylierte Form von DcuR aktiviert eine Expression der DcuSR Zielgene, unter anderem *dctA* (Abb. 17B). Fällt DctA durch chromosomale Inaktivierung als Co-Sensor weg, befindet sich das DcuSR System permanent in einem aktivierten Zustand und DcuSR Zielgene werden unabhängig vom Effektor exprimiert (nicht gezeigt).

#### 4.3 Messung von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System

Das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System ist eine Methode für die Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen. Es beruht auf funktionaler Rekonstitution einer bakteriellen Adenylatzyklase von *Bordetella pertussis* in dem Adenylatzyklase-negativen *E. coli* Stamm BTH101. Die Adenylatzyklase besteht aus den zwei Untereinheiten T25 und T18, die cAMP produzieren, wenn sie sich in unmittelbarer Nähe zueinander befinden; getrennt voneinander sind sie inaktiv. Wird das T25-Fragment an ein Protein gekoppelt und das T18-Fragment an ein anderes, kann eine Interaktion dieser Proteine nach Co-Expression beider Fusionsproteine die Funktionalität der getrennten Adenylatzyklaseuntereinheiten rekonstituieren.

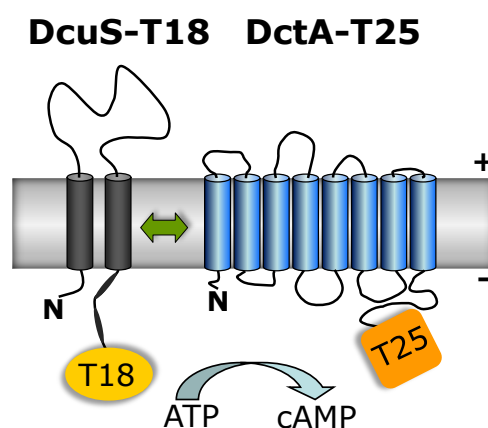


Abb. 18: **Beispiel für die Kombination von DctA und DcuS zur Messung einer Protein-Protein-Interaktion mit Hilfe des BACTH-Systems.** In diesem Fall wird die Interaktion von C-terminal fusioniertem DcuS (DcuS-T18) kombiniert mit C-terminal fusioniertem DctA (DctA-T25) gemessen. T25 und T18 sind Fragmente der bakteriellen Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis*. Bei einer Interaktion wird cAMP generiert, das über das Reporterogen *lacZ* gemessen werden kann.

Hierbei entstehendes cAMP steigert die Expression des *lacZ*-Gens und kann qualitativ oder quantitativ über einen chromogenen Farbstoff bestimmt werden. Das ist beispielhaft für eine Interaktion von DcuS mit DctA in Abb. 18 dargestellt. In diesem Beispiel ist der T18-Teil der Adenylatzyklase C-terminal an DcuS fusioniert, das T25-Fragment befindet sich C-terminal von DctA. Die qualitative Messung erfolgt über den Farbumschlag des chromogenen Indikatorfarbstoffs X-Gal in *E. coli* Kolonien von weiß (keine Interaktion) nach blau (Interaktion). Eine quantitative Messung kann durch die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität vorgenommen werden.

## 4.4 BACTH: Interaktion von DcuS mit DctA

Ein Hauptaugenmerk der Arbeit lag auf der Untersuchung der Interaktion von DctA mit DcuS. Die Regulation der DcuS-Zielgene durch DctA als Co-Sensor setzt eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen DctA und DcuS voraus. Als Arbeitshypothese galt die in Abb. 17 dargestellte Regulation durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion von DcuS mit DctA.

### 4.4.1 Interaktion von DcuS-Fusionsproteinen mit DctA-Fusionsproteinen

Die Interaktion von DctA mit DcuS konnte bereits mit FRET nachgewiesen werden (Bauer, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit diente das BACTH-System als zweite unabhängige Methode und für detailliertere Untersuchungen. DctA und DcuS waren jeweils mit T25 bzw. T18 N- oder C-terminal fusioniert. Die Funktionalität der DcuS- und DctA-Fusionsproteine wurde durch Wachstums- oder Regulationsversuche nachgewiesen (vgl. S. 102; S. 118). Diese Kombinationen wurden getestet, um geeignete Paarungen für weitere Messungen zu identifizieren. Es ergaben sich acht mögliche Kombinationen aus DctA und DcuS, deren Interaktion untersucht wurde (Abb. 19, Abb. 20).

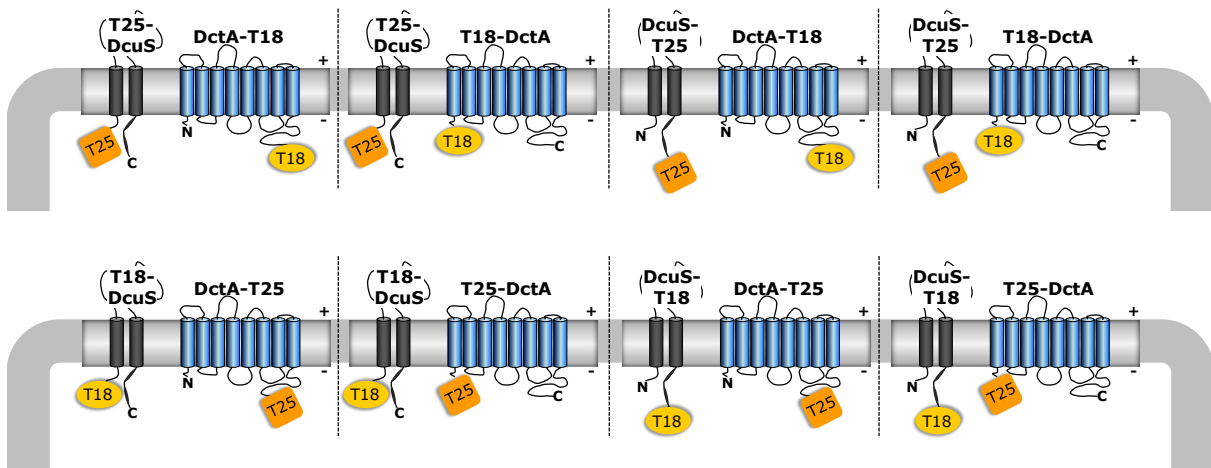


Abb. 19: **Schema aller acht möglichen Interaktionskombinationen von DcuS mit DctA im BACTH-System.** DcuS-Fusionen: DcuS-T25 (pMW919), T25-DcuS (pMW426), DcuS-T18 (pMW428), T18-DcuS (pMW429). DctA-Fusionen: DctA-T25 (pMW858), T25-DctA (pMW856), DctA-T18 (pMW918), T18-DctA (pMW917).

In dem qualitativen Testverfahren mit X-Gal konnte bei allen DcuS/DctA Fusionskombinationen eine Interaktion beobachtet werden (vgl. Tab. 17). Quantitativ messbar war



eine positive Interaktion bei sechs von acht Fusionskombinationen (Abb. 20). Die Kombinationen DctA-T25/T18-DcuS und DcuS-T25/T18-DctA blieben negativ. Die übrigen sechs Kombinationen zeigten eine eindeutige und starke Interaktion zwischen 375 MU (DctA-T25/DcuS-T18) und 761 MU (T25-DctA/T18-DcuS).

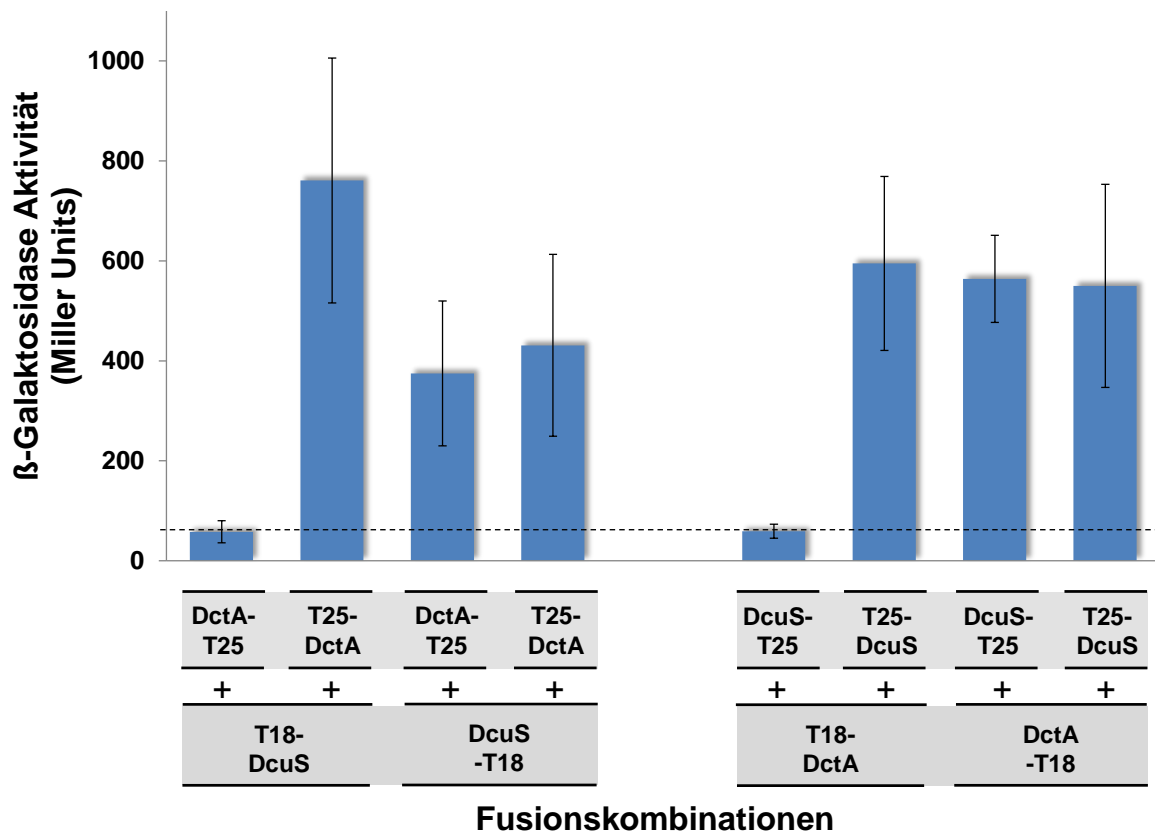


Abb. 20: **Interaktion von DctA mit DcuS in verschiedenen Fusionskombinationen.** DctA und DcuS wurden jeweils an ihrem N- oder C-Terminus mit einem T25- oder T18-Fragment fusioniert. Alle acht möglichen Kombinationen von DctA mit DcuS wurden danach auf ihre Interaktion gemessen. DctA-Fusionen: DctA-T25 (pMW858), T25-DctA (pMW856), DctA-T18 (pMW918), T18-DctA (pMW917); DcuS-Fusionen: DcuS-T25 (pMW919), T25-DcuS (pMW426), DcuS-T18 (pMW428), T18-DcuS (pMW429).

Die Spezifität dieser Interaktion wurde mit verschiedenen Kontrollen nachgewiesen (vgl. S. 119). Als Positivkontrolle diente die Kombination eines Leucin Zipperpaars (T25-Zip/T18-Zip), das bekanntermaßen eine starke Interaktion aufweist und cytosolisch lokalisiert ist. Als Negativkontrolle für alle auf ihre Interaktion hin untersuchten Proteine, wurden diese mit T25-Zip oder T18-Zip kombiniert.

Das Leucin-Zipper Element T18-Zip interagiert nicht mit T25-DcuR, T25-DcuS oder T25-DctA. Die Kolonien blieben weiß und die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität war kleiner als 55 Miller Units.

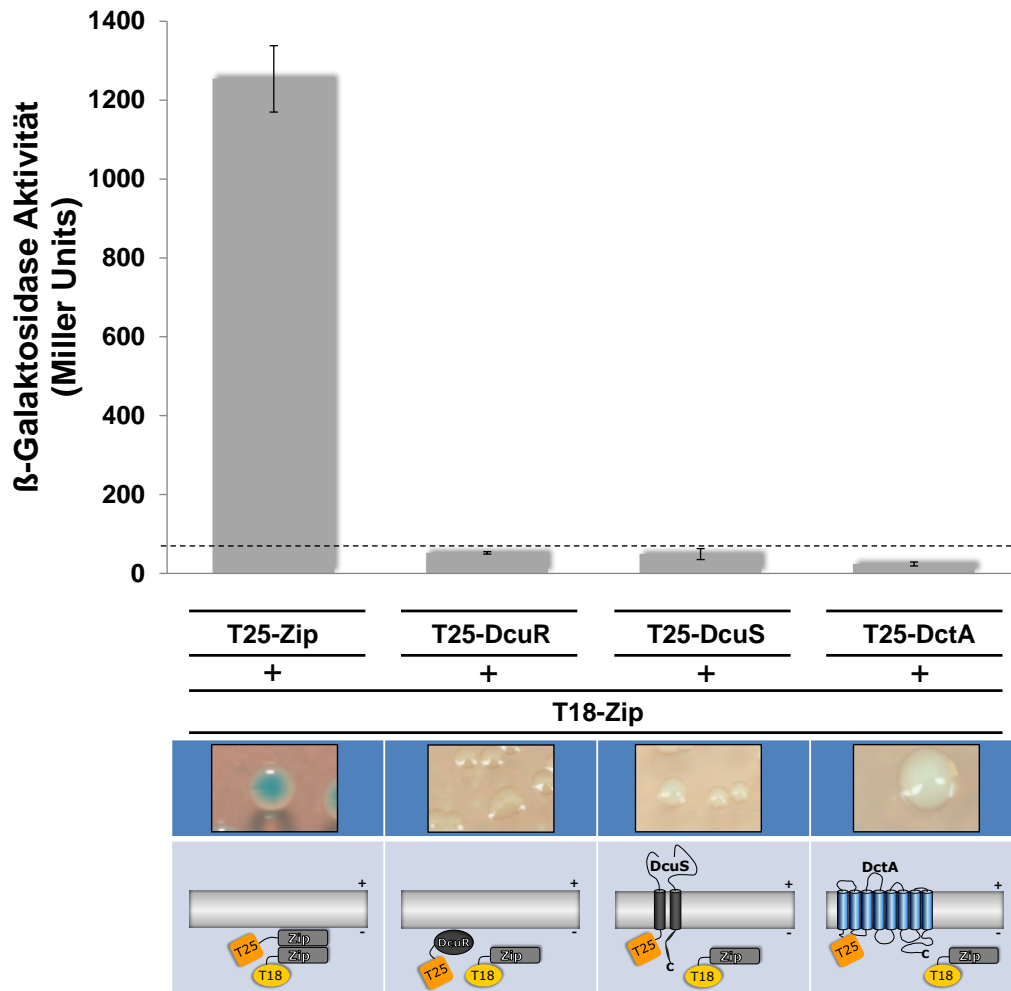


Abb. 21: Schematische Darstellung verschiedener BACTH-Konstrukte sowie quantitative und qualitative Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Protein-Protein-Interaktion zeigt sich durch blaue Kolonien auf Agarplatten mit dem Indikatorfarbstoff X-Gal und einer hohen Aktivität des Reportergens  $\beta$ -Galaktosidase in quantitativen Messungen. Fehlende Interaktion äußert sich in weißen Kolonien und einer  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität von weniger als 55 Miller Units. T25-Fusionen: T25-Zip, T25-DcuR (pMW427), T25-DcuS (pMW426), T25-DctA (pMW856); T18-Fusion: T18-Zip.

#### 4.4.2 Interaktion von DcuS mit verkürzten DctA-Varianten

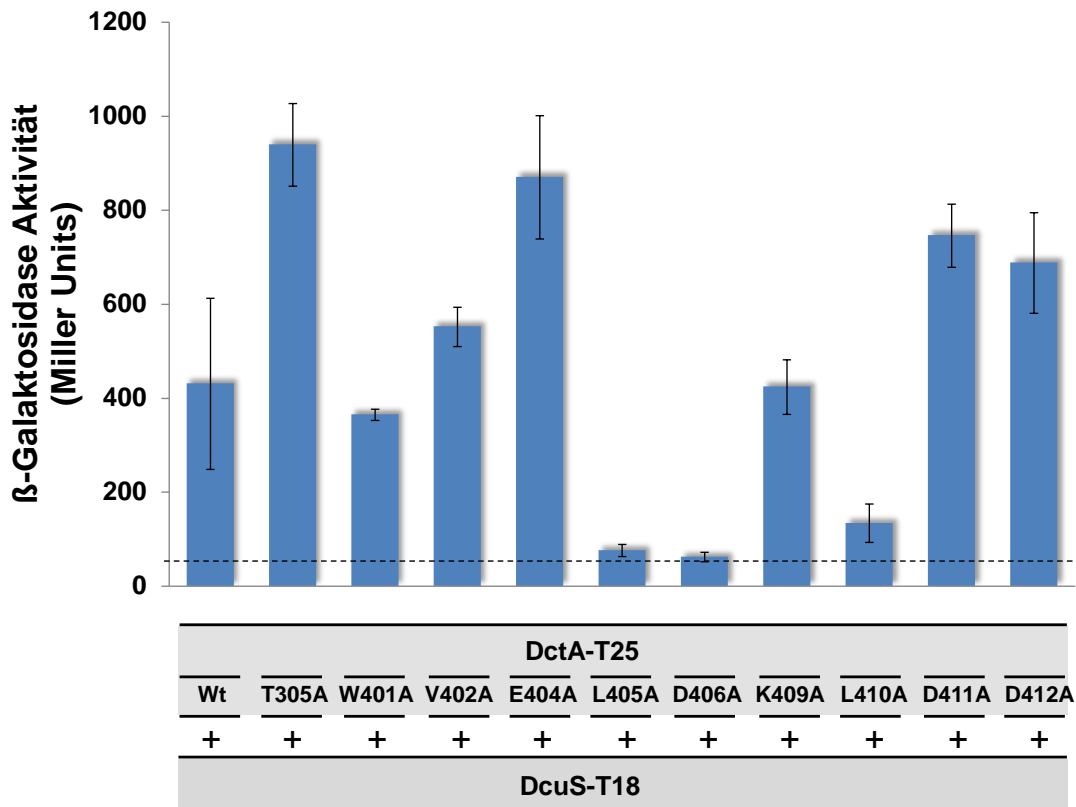
Um die mögliche Interaktionsstelle zwischen DctA und DcuS einzugrenzen, wurden verschiedene verkürzte Versionen von DctA (Abb. 22) mit DcuS kombiniert.



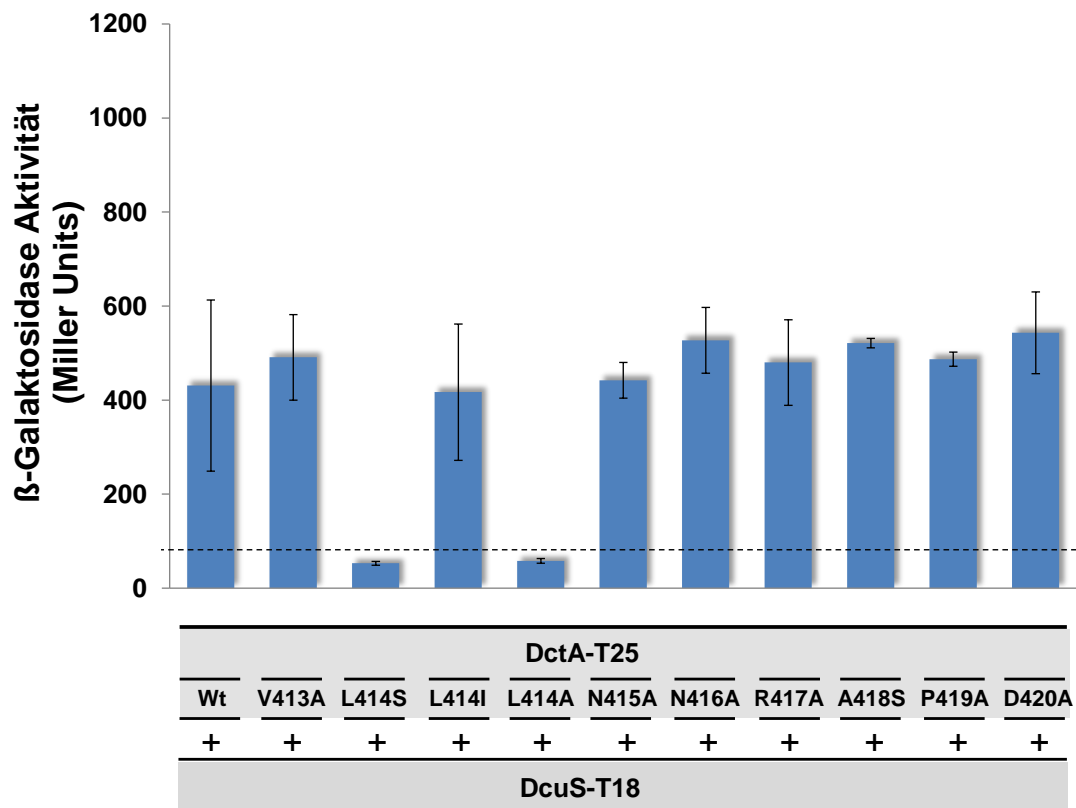
So zeigten lediglich die Konstrukte DctA<sub>1-415</sub>-T25 und DctA<sub>1-420</sub>-T25 eine Interaktion mit DcuS, kürzere Varianten jedoch nicht. Die isolierte C-terminale cytosolische Domäne von DctA zeigte ebenfalls keine Interaktion mit Vollängen DcuS-T18. Auch N-terminal verkürzte DctA-Konstrukte (T25-DctA<sub>36-428</sub>, T25-DctA<sub>73-428</sub>, T25-DctA<sub>124-428</sub>, T25-DctA<sub>168-428</sub>) zeigten keine Interaktion mehr mit DcuS-T18; die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität lag jeweils unter 55 MU (Daten nicht gezeigt). Somit sind die N- und C-terminalen Domänen von DctA wichtig für die Interaktion mit DcuS.

#### 4.4.3 Interaktion von DcuS mit DctA-Punktmutanten

Die C-terminal verkürzten DctA-Fusionen wiesen auf die Wichtigkeit des C-Terminus von DctA für die Interaktion mit DcuS hin. DctA-Einzelmutanten wurden erstellt und mit DcuS kombiniert, um essentielle Aminosäuren der DctA/DcuS-Interaktion zu identifizieren. Die Interaktion von DctA-Einzelmutanten im C-terminalen Bereich von Aminosäure 400-428 wurde mit DcuS-T18 getestet. Die meisten DctA-Punktmutanten (W401A, V402A, K409A, V413A, L414I, N415A, N416A, R417A, A418S, P419A, D420A) zeigten keine Abnahme der Interaktion mit DcuS (Abb. 24). Eine Zunahme der Interaktion war für T305A, E404A, D411A und D412A zu messen. Die DctA-Punktmutanten L405A, D406A, L410A, L414S und L414A hatten einen weitgehenden Ausfall der Interaktion zur Folge und waren daher für die Interaktion mit DcuS wichtig.



Fusionskombinationen



Fusionskombinationen

Abb. 24: **Interaktion von DctA-T25 Varianten mit DcuS-T18.** DctA-T25 (pMW858) wurde in einzelnen Aminosäuren mutiert und die resultierenden Punktmutanten mit DcuS-T18 (pMW428) kombiniert. DctA-Varianten: DctA<sub>T305A</sub>-T25 (pMW1462), DctA<sub>W401A</sub>-T25 (pMW1524), DctA<sub>V402A</sub>-T25 (pMW1525), DctA<sub>E404A</sub>-T25 (pMW1344), DctA<sub>L405A</sub>-T25 (pMW1345), DctA<sub>D406A</sub>-T25 (pMW1346), DctA<sub>K409A</sub>-T25 (pMW1527), DctA<sub>L410A</sub>-T25 (pMW1347), DctA<sub>D411A</sub>-T25 (pMW1457), DctA<sub>D412A</sub>-T25 (pMW1458), DctA<sub>V413A</sub>-T25 (pMW1459), DctA<sub>L414S</sub>-T25 (pMW1460), DctA<sub>L414I</sub>-T25 (pMW1461), DctA<sub>L414A</sub>-T25 (pMW1257), DctA<sub>N415A</sub>-T25 (pMW1258), DctA<sub>N416A</sub>-T25 (pMW1259), DctA<sub>R417A</sub>-T25 (pMW1260), DctA<sub>A418S</sub>-T25 (pMW1261), DctA<sub>P419A</sub>-T25 (pMW1262), DctA<sub>D420A</sub>-T25 (pMW1263).

Einige auffällige DctA-Mutanten der DctA-T25/DcuS-T18 Interaktion wurden zusätzlich in dem Paar DctA-T18/T25-DcuS gemessen (Abb. 25). Die Mutante E404A hatte auch hier eine erhöhte Interaktion. L414A zeigte einen völligen Verlust der Interaktion, während L405A, D406A und L410A nur zu einer verringerten Interaktion führten.

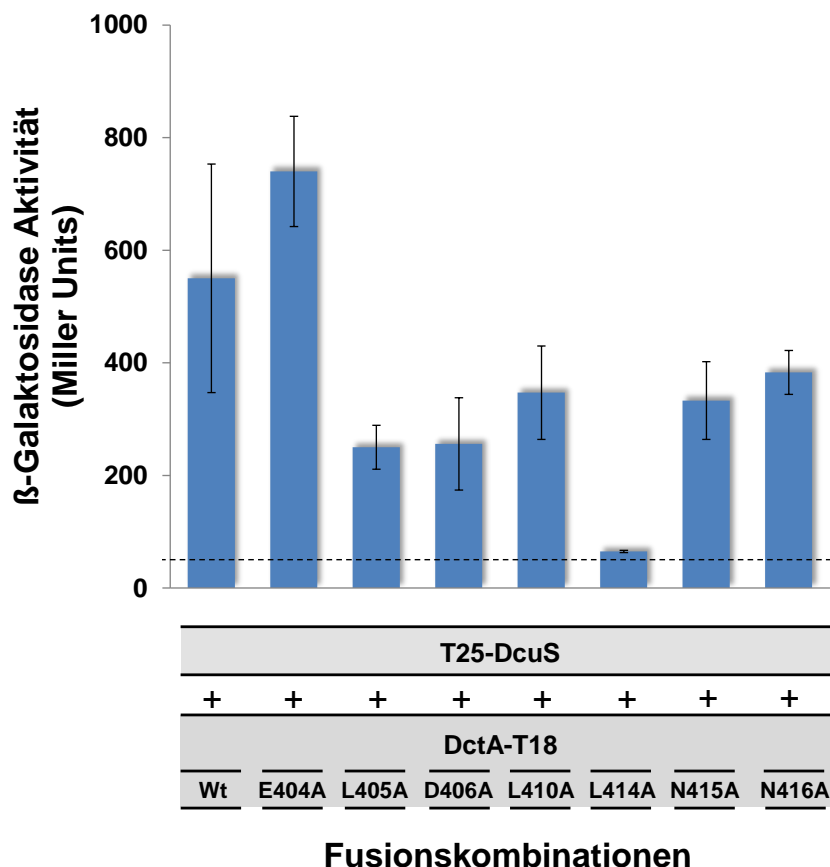


Abb. 25: **Interaktion von T25-DcuS mit DctA-T18 Varianten.** DctA-T18 (pMW918) wurde in einzelnen Aminosäuren mutiert und die resultierenden Punktmutanten mit T25-DcuS (pMW426) kombiniert. DctA-Varianten: DctA<sub>E404A</sub>-T18 (pMW1347-2), DctA<sub>L405A</sub>-T18 (pMW1348), DctA<sub>D406A</sub>-T18 (pMW1349), DctA<sub>L410A</sub>-T18 (pMW1350), DctA<sub>L414A</sub>-T18 (pMW1264), DctA<sub>N415A</sub>-T18 (pMW1265), DctA<sub>N416A</sub>-T18 (pMW1266).

Die zwei in der Interaktion verringerten DctA-Mutanten D406A und L414A wurden zusätzlich in T25-DctA/T18-DcuS und T25-DctA/DcuS-T18 gemessen (Abb. 26). Beide Mutanten zeigten in diesen Kombinationen keine Interaktion. Die Mutante L414A zeigte ebenfalls keine Interaktion bei DcuS-T25/DctA-T18.

Einzelmutationen von DctA an den Aminosäuren L405, D406, L410 und L414 führten durchgehend zu einer verringerten oder fehlenden Interaktion, wenn ein Austausch durch Alanin stattgefunden hatte. Der Austausch von L414 durch die strukturell ähnliche Aminosäure Isoleucin (L414I) führte hingegen zu keinem Ausfall der Interaktion. Diese Ergebnisse sind ein starker Hinweis auf die Relevanz dieser Aminosäuren in der Interaktion von DctA mit DcuS.

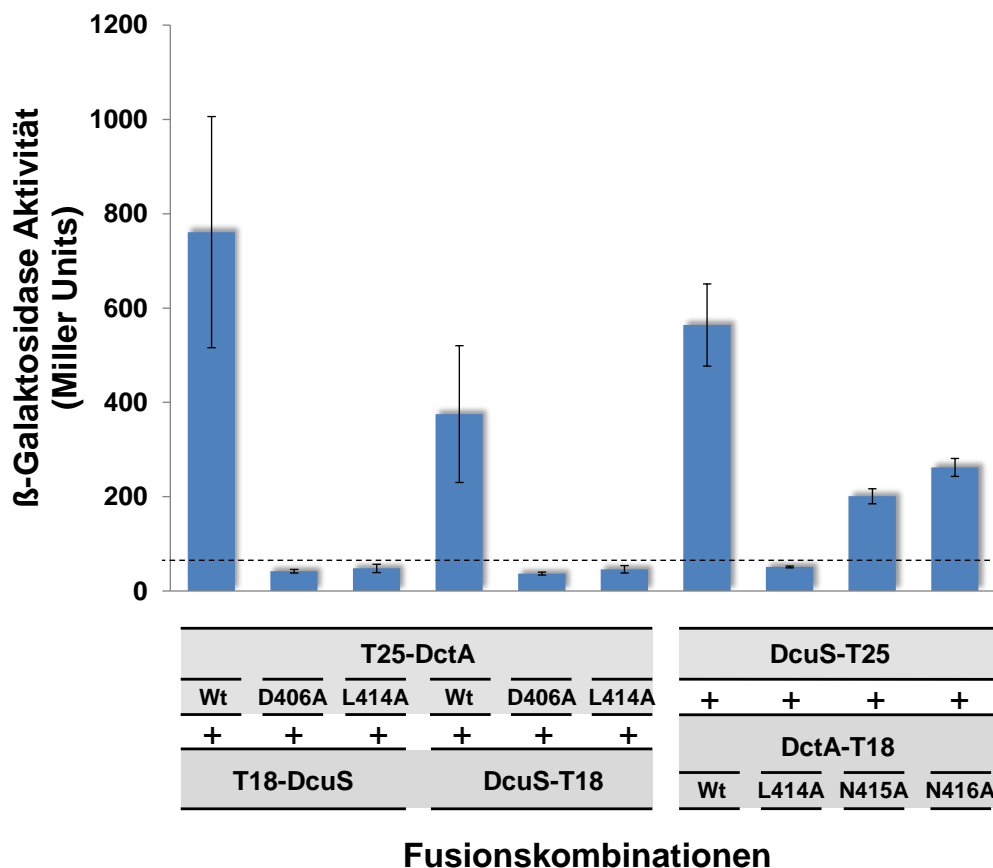


Abb. 26: **Interaktion ausgesuchter DctA-Varianten mit DcuS.** T25-DctA und (pMW856) DctA-T18 (pMW918) wurden in einzelnen Aminosäuren mutiert und die resultierenden Punktmutanten mit T18-DcuS (pMW429), DcuS-T18 (pMW428) oder DcuS-T25 (pMW919) kombiniert. DctA-Varianten: T25-DctA<sub>D406A</sub> (pMW1478), T25-DctA<sub>L414A</sub> (pMW1479), DctA<sub>L414A</sub>-T18 (pMW1264), DctA<sub>N415A</sub>-T18 (pMW1265), DctA<sub>N416A</sub>-T18 (pMW1266).

#### 4.4.4 Interaktion von verkürzten DcuS-Varianten mit DctA

Um die Interaktionsstelle von DctA mit DcuS von der DcuS-Seite genauer zu bestimmen, wurden verschiedene verkürzte DcuS-Konstrukte verwendet (Abb. 27). Das Volllängenkonstrukt DcuS-T18 wurde hierfür schrittweise C-terminal abgeschnitten. Das erste verkürzte Konstrukt bildete DcuS-PAS<sub>C</sub>-T18, bei dem die Kinasedomäne entfernt wurde. Bei dem zweiten Konstrukt DcuS-TM2-T18 wurde zusätzlich zur Kinasedomäne noch die PAS<sub>C</sub>-Domäne entfernt. Sowohl die PAS<sub>C</sub>- als auch die Kinasedomäne wurden ebenfalls ohne den restlichen Teil von DcuS kloniert. Sie wurden zusammen und einzeln an T18 fusioniert. Alle Konstrukte wurden an ihrem C-Terminus mit dem T18-Fragment fusioniert.

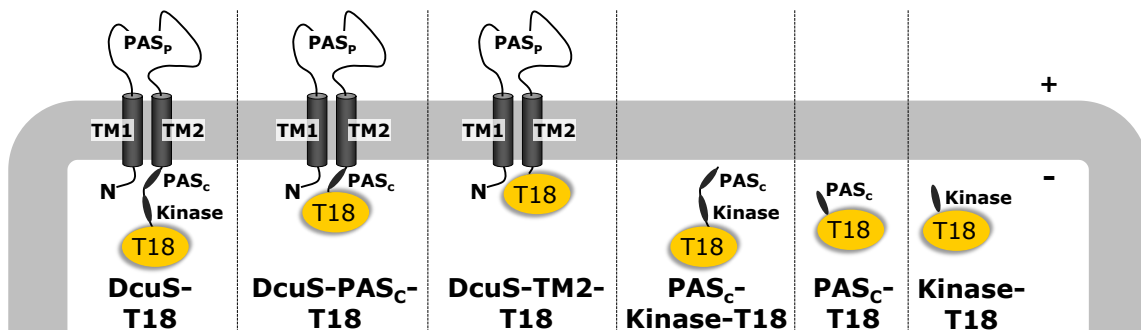


Abb. 27: Schematische Darstellung der verkürzten DcuS-Konstrukte, die für Analysen im BACTH (Bacterial Two-Hybrid) System verwendet wurden. Sowohl N- als auch C-Terminus aller verwendeten Konstrukte liegen cytoplasmatisch. TM1 = Transmembranhelix 1, TM2 = Transmembranhelix 2, PAS<sub>p</sub> = periplasmatische PAS-Domäne, PAS<sub>C</sub> = cytoplasmatische PAS-Domäne, Kinase = Kinasedomäne.

Die Interaktion von wildtypischem DctA-T25 war in Kombination mit DcuS-PAS<sub>C</sub>-T18 vergleichbar mit der von wildtypischem DctA-T25 mit Volllängen DcuS-T18, die Standardabweichung war jedoch ein wenig geringer. Die Deletion der Kinasedomäne änderte somit nicht die absolute Aktivität, aber ohne Kinasedomäne gestaltete sich diese stabiler. Eine Deletion der PAS<sub>C</sub>-Domäne (DcuS-TM2-T18) ergab mit DctA-T25 eine um den Faktor 4,6 geringere Interaktion als DcuS-T18. Diese geringere Interaktion war in wildtypischem DctA-T25 und DctA<sub>N415A</sub>-T25 ebenso vorhanden, fehlte aber in DctA<sub>L414A</sub>-T25. Die PAS<sub>C</sub>-Domäne könnte also eine Rolle in der Interaktion von DcuS mit DctA spielen. Allerdings zeigte weder die isolierte Kinasedomäne, noch die isolierte PAS<sub>C</sub>-Domäne eine Interaktion mit DctA-T25 oder T25-DctA. Auch PAS<sub>C</sub>-Kinase-T18 ohne das restliche DcuS zeigte keine Interaktion mit DctA-T25, bildete aber, im Gegensatz zu den isolierten PAS<sub>C</sub>- und Kinase-Domänen, Homodimere (Degreif-Dünnwald, 2011).



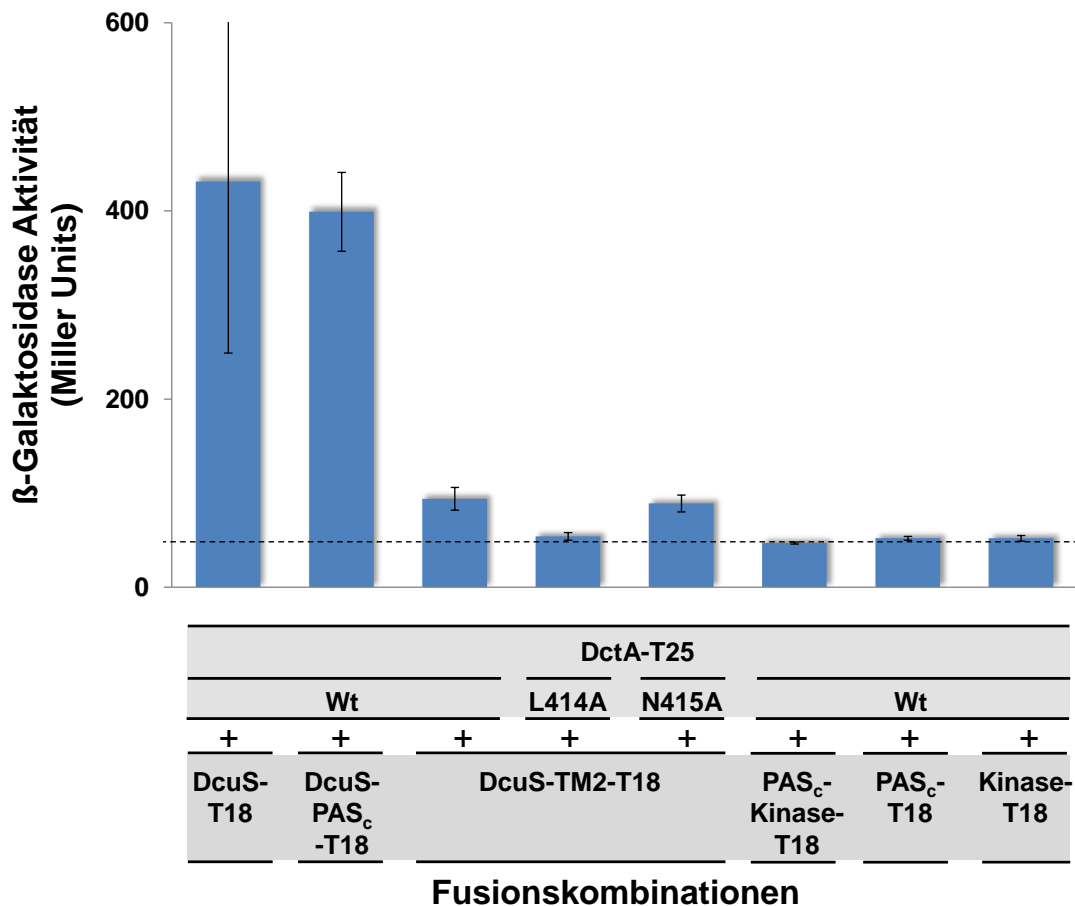


Abb. 28: **Interaktion von DctA-T25 mit verkürzten DcuS-T18 Varianten.** C-terminal fusioniertes DctA (DctA-T25, pMW858) wurde mit DcuS ohne Kinase-Domäne (DcuS-PAS<sub>c</sub>-T18, pMW950), DcuS ohne Kinase- und PAS<sub>c</sub>-Domäne (DcuS-TM2-T18, pMW948), der einzelnen PAS<sub>c</sub>- (PAS<sub>c</sub>-T18, pMW952) bzw. Kinase-Domäne (Kinase-T18, pMW954) und der PAS<sub>c</sub>- plus Kinase-Domäne (PAS<sub>c</sub>-Kinase-T18, pMW1076) kombiniert. Außerdem wurden die beiden Punktmutanten DctA<sub>L414A</sub>-T25 (pMW1257) und DctA<sub>N415A</sub>-T25 (pMW1258) mit DcuS-TM2-T18 kombiniert.

#### 4.4.5 Interaktion von DcuS-Punktmutanten mit DctA

Von DcuS gibt es verschiedene Punktmutanten in der periplasmatischen PAS<sub>P</sub>-Domäne und in der cytoplasmatischen PAS<sub>C</sub>-Domäne, die die Expression der DcuS-Zielgene ändern (Krämer, 2007; Degreif-Dünnwald, 2011; Monzel, 2011). Es konnten zwei vom Wildtyp abweichende Phänotypen ermittelt werden: ON- und OFF-Mutanten. In ON-Mutanten war DcuS permanent aktiv, was zu einer konstitutiven Expression der DcuS-Zielgene unabhängig von Effektoren (C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren) führte. Bei OFF-Mutanten zeigte DcuS keine Aktivität mehr, die Zielgene wurden nicht exprimiert. Ein Teil der Mutanten stört die Homodimerisierung von DcuS im BACTH-System (Degreif-Dünnwald, 2011). Hier wurde die Interaktion der DcuS-Punktmutanten (Abb. 29) in verschiedenen Kombinationen mit DctA untersucht. Für die Interaktionsmessungen wurde DcuS mit T25 oder T18 fusioniert

und es wurden auch verkürzte Fusionen verwendet (Daten nicht gezeigt). Aus der PAS<sub>P</sub>-Domäne wurden die Mutanten K55A (ON), R107A (OFF), H110A (OFF), F120A (OFF) untersucht. Aus der PAS<sub>C</sub>-Domäne wurde die Mutanten N248D (ON), N304D (ON), V276A (OFF), F221A (OFF) mit DctA gemessen.

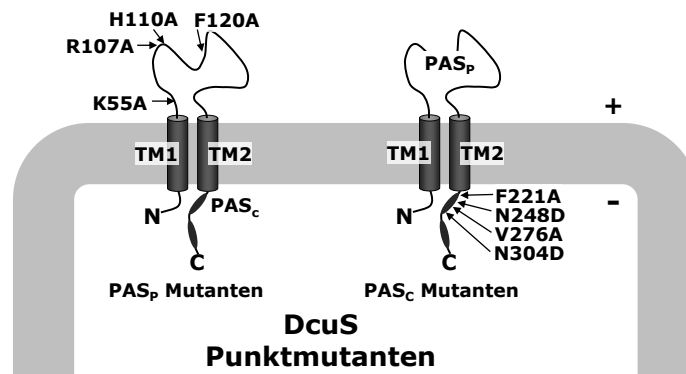


Abb. 29: Schematische Darstellung der DcuS-Punktmutanten, die für Analysen im BACTH (Bacterial Two-Hybrid) System verwendet wurden. Sowohl N- als auch C-Terminus aller verwendeten Konstrukte liegen cytoplasmatisch. TM1 = Transmembranhelix 1, TM2 = Transmembranhelix 2, PAS<sub>P</sub> = periplasmatische PAS-Domäne, PAS<sub>C</sub> = cytoplasmatische PAS-Domäne.

Ähnlich wie in der Kombination mit DctA-T25, zeigte DcuS-PAS<sub>C</sub>-T18 auch in Kombination mit T25-DctA eine fast wildtypische  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität und keine Aktivität mit isolierter PAS<sub>C</sub>- oder Kinase-Domäne (Abb. 30). Im Unterschied dazu verhielt sich die Kombination von T25-DctA mit wildtypisch verkürztem DcuS (DcuS-TM2-T18) wie die Kombination mit Vollängen DcuS-T18, zeigte also keine verminderte Interaktion. Ebenso verhielten sich auch alle drei getesteten OFF-Mutanten der periplasmatischen PAS-Domäne von DcuS R107A, H110A und F120A. Diese drei OFF-Mutanten sitzen alle in der Substratbindetasche und sind wichtig für die Erkennung von Substraten. Die ON-Mutante K55A liegt am N-terminalen Ende der PAS<sub>P</sub>-Domäne und ist nicht an der Substratbindung beteiligt. Die verkürzte DcuS-Variante DcuS-TM2-T18 mit der Mutation K55A hatte, verglichen mit dem entsprechenden Wildtyp, eine um den Faktor 6 verminderte Interaktion mit DctA und lag nur noch knapp über dem Schwellenwert für eine positive Interaktion.

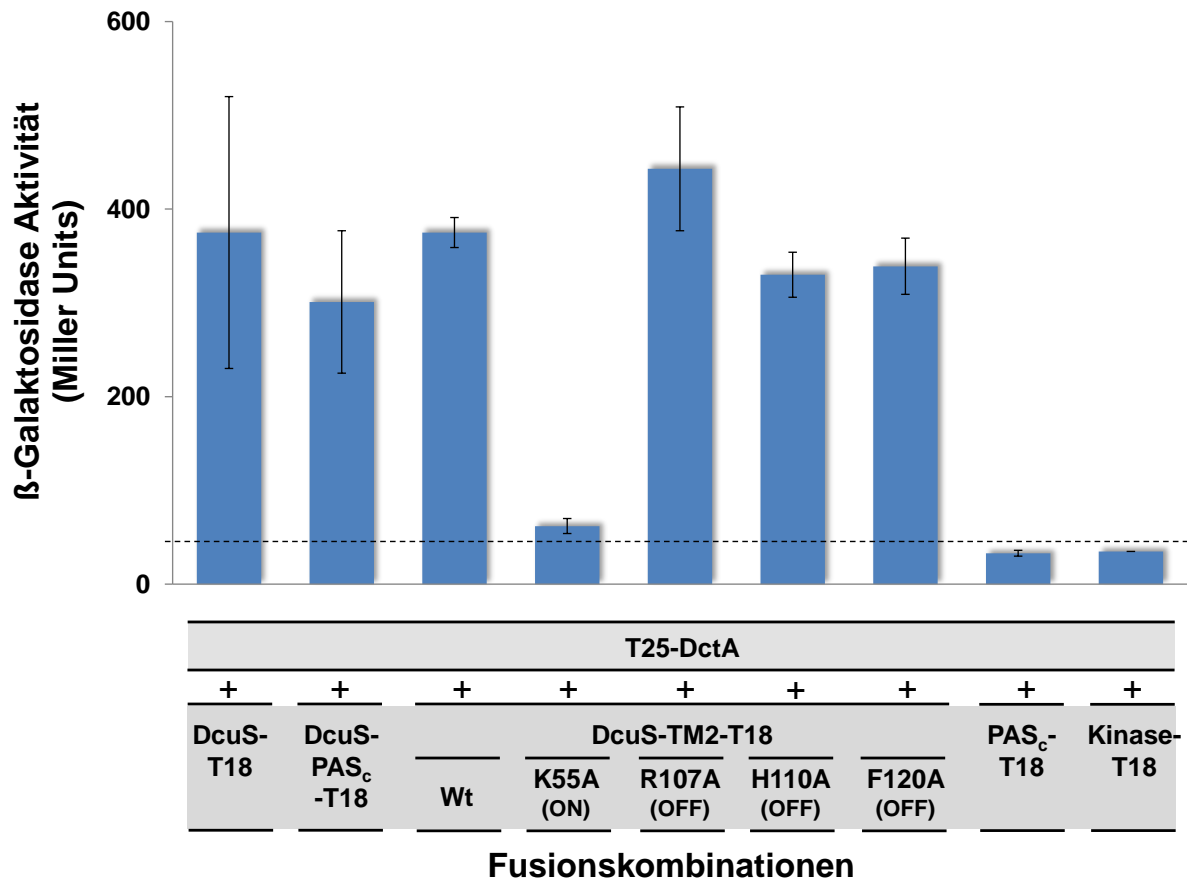


Abb. 30: **Interaktion von T25-DctA mit verkürzten DcuS-T18 Varianten.** N-terminal fusioniertes DctA (T25-DctA, pMW856) wurde mit DcuS ohne Kinasedomäne (DcuS-PAS<sub>c</sub>-T18, pMW950), DcuS ohne Kinase- und PAS<sub>c</sub>-Domäne (DcuS-TM2-T18, pMW948) und der einzelnen PAS<sub>c</sub>- (PAS<sub>c</sub>-T18, pMW952) bzw. Kinase-Domäne (Kinase-T18, pMW954) kombiniert. Außerdem wurden vier Punktmutanten von DcuS-TM2-T18 mit T25-DctA kombiniert. Die Mutationsorte befinden sich alle in der periplasmatischen PAS<sub>p</sub>-Domäne. Mutation der Reste R107A (DcuS-TM2<sub>R107A</sub>-T18, pMW978), H110A (DcuS-TM2<sub>H110A</sub>-T18, pMW980) und F120A (DcuS-TM2<sub>F120A</sub>-T18, pMW982) führen in Vollängen-DcuS zu fehlender Zielgenexpression (OFF-Phänotyp), wohingegen K55A (DcuS-TM2<sub>K55A</sub>-T18, pMW1400) zu konstitutiver Zielgenexpression führt (ON-Phänotyp).

Weitere Untersuchungen wurden mit Punktmutanten in der cytoplasmatischen PAS<sub>c</sub>-Domäne durchgeführt (Abb. 31). Mutation der Aminosäure N248D in DcuS führte in allen Kombinationen mit DctA zu einer sehr niedrigen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität unterhalb der Grenze für spezifische Interaktion. Dies war auch bei der DcuS-Homodimerisierung der Fall (Degreif-Dünnwald, 2011). Die andere ON-Mutante (N304D) zeigte keine Aktivität, wenn das entsprechende DcuS-Konstrukt C-terminal fusioniert war (DcuS-T18 und DcuS-PAS<sub>c</sub>-T18). Das konnte auch bei der DcuS/DcuS-Interaktion beobachtet werden (Degreif-Dünnwald, 2011). In der Kombination von T25-DctA/T18-DcuS zeigten auch alle anderen Mutanten eine reduzierte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Dies war genauso für die T25-DcuS Aktivität in Kombination mit T18-DcuS der Fall (Degreif-Dünnwald, 2011). Dieser Effekt hing von der

Expressionsstärke von DcuS ab, wie sich anhand der Interaktion T25-DcuS/T18-DctA beobachten ließ. Das T18-Fragment wird durch ein Plasmid hoher Kopienzahl kodiert, wohingegen die T25-Fusion durch ein Plasmid niedriger Kopienzahl kodiert wird. Wurde DctA im Vergleich zu DcuS stärker überexprimiert, war statt einer verminderten Interaktion eher eine größere Interaktion zwischen DctA und DcuS zu beobachten.

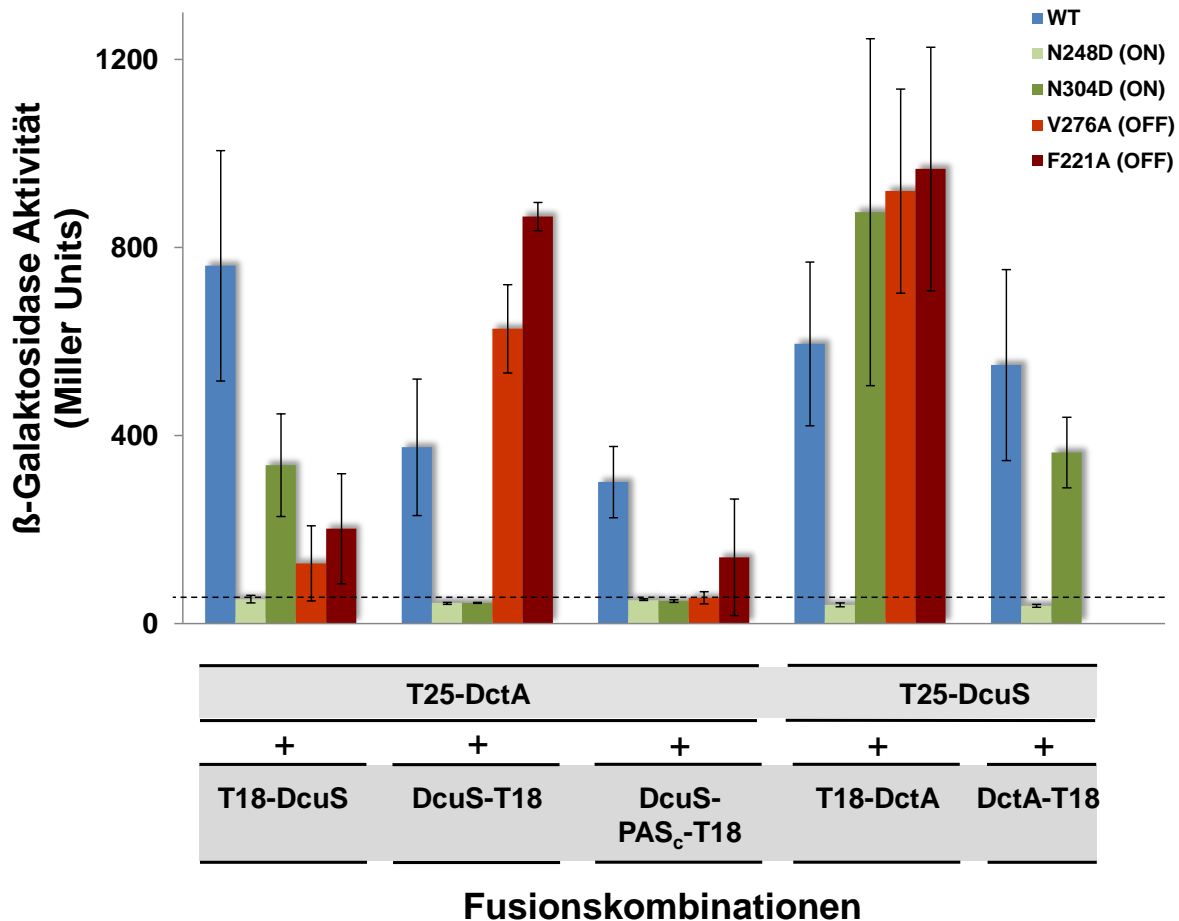


Abb. 31: **Interaktion von wildtypischem DctA mit verschiedenen DcuS-Varianten.** N-terminal fusioniertes DctA (T25-DctA, pMW856; T18-DctA, pMW917) oder C-terminal fusioniertes DctA (DctA-T18, pMW918) wurde mit verschiedenen DcuS-Fusionsproteinen kombiniert. Dabei wurde wildtypisches DcuS (blau) oder eine der vier in der cytoplasmatischen PAS<sub>C</sub>-Domäne liegenden Punktmutanten N248D, N304D, V276A, F221A verwendet. Die zwei verwendeten ON-Mutanten N248D (hellgrün, T18-DcuS<sub>N248D</sub>, pMW1012; DcuS<sub>N248D</sub>-T18, pMW1056; DcuS-PAS<sub>C-N248D</sub>-T18, pMW992, T25-DcuS<sub>N248D</sub>, pMW1011) und N304D (dunkelgrün, T18-DcuS<sub>N304D</sub>, pMW1014; DcuS<sub>N304D</sub>-T18, pMW1057; DcuS-PAS<sub>C-N304D</sub>-T18, pMW994, T25-DcuS<sub>N304D</sub>, pMW1013) verursachen eine konstitutive Expression der DcuS-Zielgene. Die zwei verwendeten OFF-Mutanten V276A (hellrot, T18-DcuS<sub>V276A</sub>, pMW1016; DcuS<sub>V276A</sub>-T18, pMW1058; DcuS-PAS<sub>C-V276A</sub>-T18, pMW996, T25-DcuS<sub>V276A</sub>, pMW1015) und F221A (dunkelrot, T18-DcuS<sub>F221A</sub>, pMW1018; DcuS<sub>F221A</sub>-T18, pMW1059; DcuS-PAS<sub>C-F221A</sub>-T18, pMW998, T25-DcuS<sub>F221A</sub>, pMW1017) verursachen eine stark verminderte Expression der DcuS-Zielgene.

## 4.5 BACTH: Interaktion von verkürztem DctA als MalE-Fusionsprotein mit DcuS

Mit den bisher dargestellten Experimenten konnte nicht gezeigt werden, ob der C-Terminus von DctA mit der cytosolischen Helix 8b für die DctA/DcuS-Interaktion wichtig ist oder ob dieser Interaktionsverlust sekundär durch einen Verlust der DctA/DctA-Interaktion (vgl. S. 103-106) bedingt war. Um das zu untersuchen, wurden membranintegrale verkürzte DctA-Varianten alleine oder als Fusionen mit dem periplasmatischen Maltose Bindeprotein MalE (Alternativname MBP) gebildet. Das periplasmatische Bindeprotein MalE besitzt eine N-terminale „Leader-Sequenz“, mit deren Hilfe es über das SecB-System in das Periplasma exportiert wird.

### 4.5.1 MalE-Fusionsproteine und deren funktionaler Export in das Periplasma

DctA-Varianten zeigten bei einer Verkürzung des C-Terminus um mehr als 13 Aminosäuren keine Interaktion mehr mit DcuS oder DctA (vgl. S. 76). Deshalb wurde für Interaktionsstudien eine Fusion des C-terminalen DctA-Bereichs mit MalE kloniert.

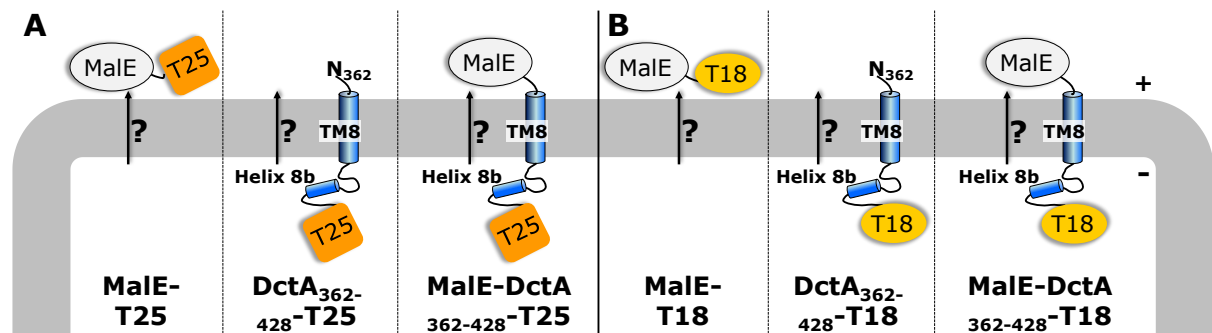


Abb. 32: Schematische Darstellung der erwünschten Lokalisation von verkürzten DctA- und MalE-Fusionen, die für Analysen im BACTH (Bacterial Two-Hybrid) System verwendet wurden. Dargestellt sind die Konstrukte (A) MalE-T25 (pMW1645), DctA<sub>362-428</sub>-T25 (pMW1641), MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T25 (pMW1647) und (B) MalE-T18 (pMW1646), DctA<sub>362-428</sub>-T18 (pMW1643), MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T18 (pMW1648). Die erwünschte Lokalisation der Konstrukte in der Membran ist dargestellt und aufgrund der hypothetischen Annahme mit einem Pfeil plus Fragezeichen markiert.

DctA wurde N-terminal bis zu TM8 verkürzt, so dass nur noch ein kurzer peri-plasmatischer Bereich der Aminosäuren 362 bis 366 vorhanden war, gefolgt von dem vollständigen, C-terminalen Teil mit TM8 und der vorhergesagten cytosolischen Helix 8b bis zur letzten Aminosäure 428 (Abb. 32A und B). Vor diesen Bereich wurde MalE fusioniert. Die Konstrukte MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T25 und MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T18 sollten ein peri-plasmatisches MalE besitzen, gefolgt von TM8, Helix 8b und dem T25- oder T18-Fragment.

Zur Kontrolle der peri-plasmatischen Lokalisierung von MalE, wurde der Stamm NT326 mit dem Plasmid transformiert. NT326 enthält das Maltose-Operon ohne das *malE*-Gen. Dieser Stamm kann auf Platten mit M9 Minimalmedium, supplementiert durch Maltose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle, nicht wachsen. Die für die verschiedenen Fusionsproteine kodierenden Plasmide (Abb. 32) wurden in NT326 transformiert und auf M9- Maltose-agarplatten mit IPTG zur Induktion und Kanamycin (T25-Plasmide, Abb. 33A) oder Ampicillin (T18-Plasmide, Abb. 33B) zur Selektion ausgestrichen. Als Positivkontrolle wurde leeres pKNT25 oder pUT18 Plasmid transformiert und in einen im Maltoseabbau funktionellen Stamm transformiert (Abb. 33, IV). Alle Fusionen, die plasmidkodiertes MalE und T25 enthielten, wuchsen auf Maltose (Abb. 33A, I-III). Deshalb bilden die Konstrukte MalE-T25, MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T25 und MalE-DctA<sub>362-428-L414A</sub>-T25 peri-plasmatisch lokalisiertes MalE.

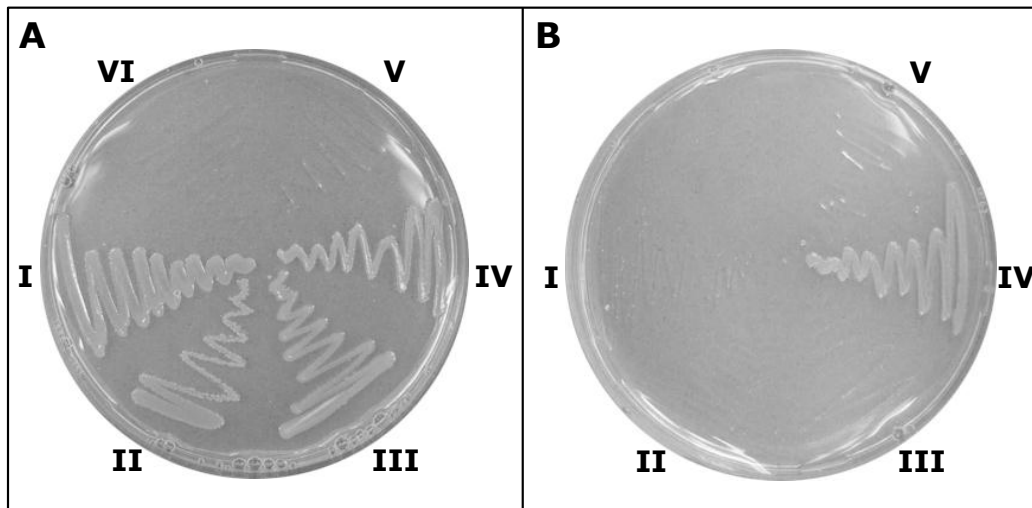


Abb. 33: **Wachstumskomplementation des MalE defizienten Stamms NT326 durch MalE kodierende Fusionsproteine auf Maltoseplatten (vgl. Abb. 34).** (A) Wachstumskomplementation durch die T25-Fusionen: MalE-T25 (I), MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T25 (II), MalE-DctA<sub>362-428-L414A</sub>-T25 (III), Kontrolle (IV), DctA<sub>362-428</sub>-T25 (V), DctA<sub>362-428-L414A</sub>-T25 (VI). (B) Wachstumskomplementation durch die T18-Fusionen: MalE-T18 (I), MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T18 (II), DctA<sub>362-428-L414A</sub>-T18 (III), Kontrolle (IV), DctA<sub>362-428</sub>-T18 (V).

Plasmide, die nur für DctA<sub>362-428</sub>-T25 oder DctA<sub>362-428-L414A</sub>-T25 kodierte, komplementierten den Wachstumsdefekt erwartungsgemäß nicht, da hier kein MalE produziert wurde. Auf der anderen Seite konnte keines der MalE enthaltenden T18-Plasmide komplementieren. So wuchs weder MalE-T18 noch MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T18 und wie erwartet auch nicht DctA<sub>362-428-L414A</sub>-T18 und DctA<sub>362-428</sub>-T18. Die Ergebnisse der Wachstumskomplementation (Abb. 33) widersprachen der in Abb. 32 angenommenen Topologie der T18-Fusionsproteine. Wahrscheinlich sind die Fusionsproteine MalE-T18 und MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T18 deshalb im Cytoplasma lokalisiert, wobei die Lokalisation von DctA<sub>362-428</sub>-T25 und DctA<sub>362-428</sub>-T18 nicht überprüft wurde (Abb. 34). Die Proteine sind wahrscheinlich inaktiv im Cytoplasma oder wurden degradiert.

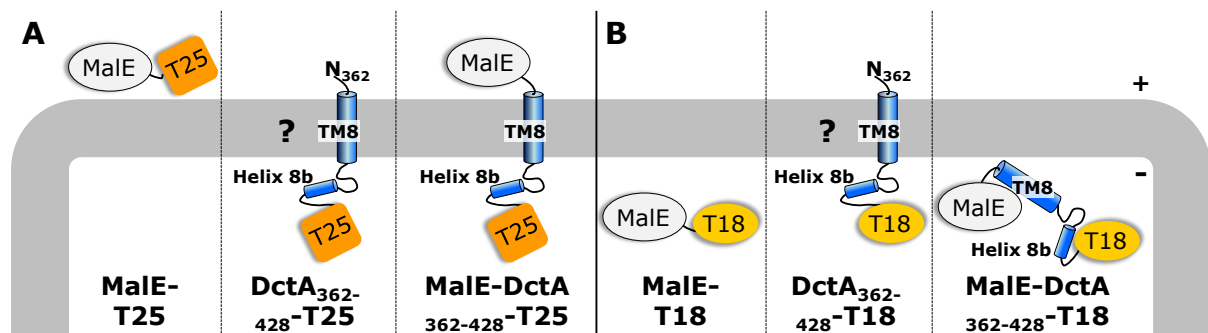


Abb. 34: Schematische Darstellung der verkürzten DctA- und MalE-Fusionen, die für Analysen im BACTH (Bacterial Two-Hybrid) System verwendet wurden. Bei den mit einem Fragezeichen markierten Konstrukten ist der Einbau in die Membran fraglich.

#### 4.5.2 Interaktion der C-terminalen Region von DctA mit DcuS

DctA<sub>362-428</sub>-T25 zeigte keine Interaktion mit T18-DcuS oder DcuS-T18. Ebenso zeigten weder DctA<sub>362-428</sub>-T18 noch MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T18 mit T25-DcuS oder DcuS-T25 eine Aktivität. MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T25 als Wildtyp oder als L414A-Variante hingegen zeigten eine spezifische Aktivität. Diese betrug für MalE-DctA<sub>362-428-L414A</sub>-T25 40 % (DcuS-T18) und 30 % für (T18-DcuS), verglichen mit der wildtypischen Fusion. Die Interaktion von Vollängen-DctA oder -DcuS war im Vergleich zu den MalE-Fusionen deutlich niedriger. Das könnte durch die erhöhte Flexibilität des nur eine Transmembranhelix enthaltenden MalE-DctA Konstrukts bedingt sein. Durch die allgemein höhere Aktivität zeigten auch die L414A Varianten eine Interaktion. Die MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T25 Expression war nicht stabil. Es entstanden bei der Kombination von MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T25 mit Vollängen-DcuS jeweils blaue und weiße

Kolonien (Abb. 35). Für die Messungen wurden jeweils die blauen Kolonien genommen, da sich diese in Kontrollen mit CitA und Tsr nicht zeigten und somit spezifisch für DctA und DcuS schienen (Abb. A6).

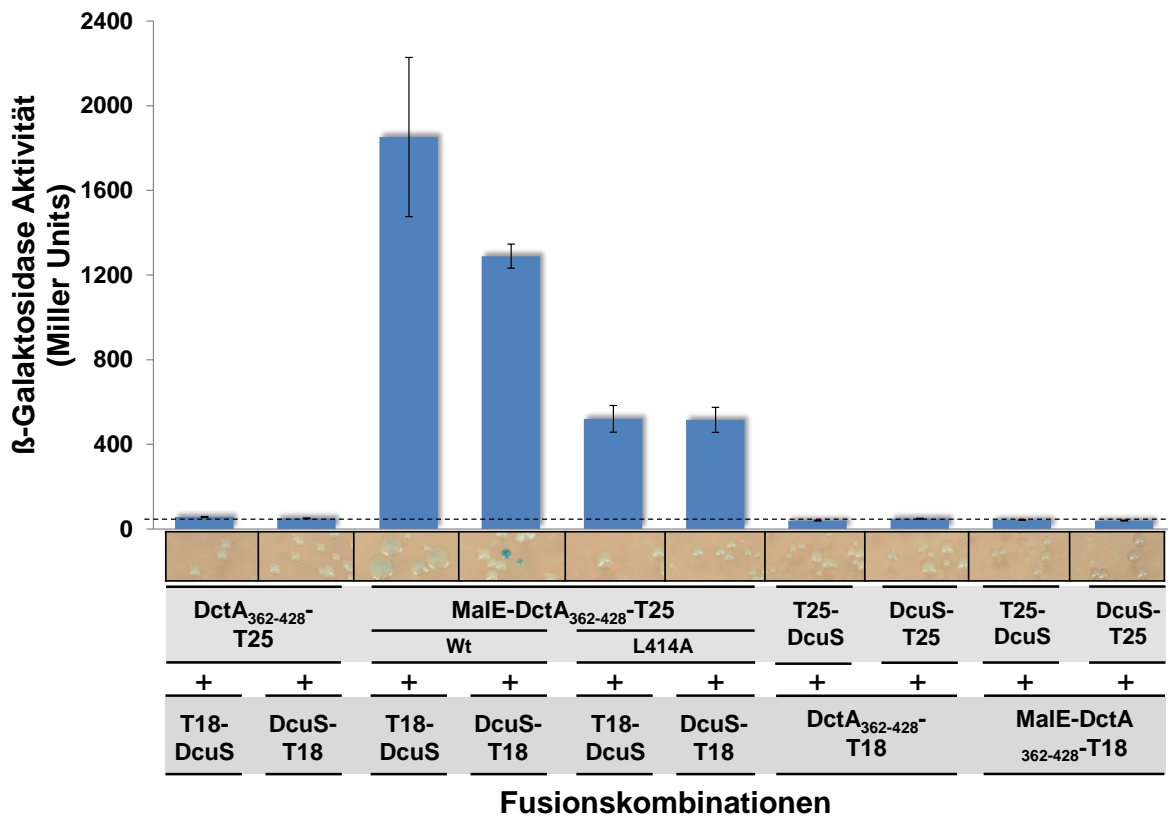


Abb. 35: **Interaktion von MalE-fusionierten oder unfusionierten DctA-Konstrukten mit DcuS.** N-terminal verkürztes DctA-T25 ohne (DctA<sub>362-428</sub>-T25, pMW1641) oder mit N-terminaler MalE-Fusion (MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T25, pMW1647; MalE-DctA<sub>362-428-L414A</sub>-T25, pMW1649) wurde mit N- oder C-terminal fusioniertem DcuS (T18-DcuS, pMW429; DcuS-T18, pMW428) kombiniert. In umgekehrter Kombination wurde N- oder C-terminal fusioniertes DcuS (T25-DcuS, pMW426; DcuS-T25, pMW919) mit DctA<sub>362-428</sub>-T18 (pMW1643), DctA<sub>362-428-L414A</sub>-T18 (pMW1644) und MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T18 (pMW1648) transformiert. Zusätzlich ist die Färbung der Kolonien angegeben.



## 4.6 BACTH: Effekt von Fumarat auf die Interaktion von DctA mit DcuS

Ist das Interaktionsmodell von DcuS und DctA korrekt (Abb. 17), sollte die Interaktion zwischen DcuS und DctA abhängig von der Anwesenheit des Effektors Fumarat sein. Das BACTH-System wurde benutzt, um die Fumaratabhängigkeit der Interaktion zu untersuchen. Wie bei den vorherigen Interaktionsmessungen wurden alle acht möglichen Interaktionskombinationen von DcuS mit DctA (Abb. 20) auf ihre Interaktion mit oder ohne Fumarat als Effektor getestet. Nach Zucht im komplexem LB-Nährmedium konnte keine signifikante Veränderung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde das Minimalmedium eM9 mit Glycerin oder Fumarat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zur Zucht eingesetzt.

### 4.6.1 Fumaratabhängigkeit der Interaktion von DctA mit DcuS

Die Fumaratabhängigkeit der Interaktion der wildtypischen DctA- und DcuS-Fusionsproteine wurde in allen acht Kombinationen bestimmt (Abb. 36, Abb. 37). Die Kombinationen DctA-T25/T18-DcuS und DcuS-T25/DctA-T18 lieferten mit und ohne Fumarat nur geringe  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten. Die Paare DctA-T25/DcuS-T18, T25-DctA/DcuS-T18 und DcuS-T25/T18-DctA hatten bei Zucht auf Glycerin eine wesentlich höhere  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zu der Zucht auf Fumarat als einziger Kohlenstoffquelle (Erhöhung um den Faktor 3,3; 6,7 und 2,1). Das stimmt mit der Vorstellung des Modells (Abb. 17) überein, laut der DcuS und DctA nur in Abwesenheit von Fumarat interagieren und diese Interaktion zu einer negativen Regulation der Genexpression von *dctA* führt. Gegenteilig zu diesem Modell verhielten sich jedoch die Messwerte der jeweils N-terminal fusionierten Interaktionskombinationen T25-DctA/T18-DcuS und T25-DcuS/T18-DctA. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten der N-terminalen Fusionskombinationen waren, verglichen mit denen der anderen, höher. Mit Fumarat wurde bei T25-DctA/T18-DcuS eine Aktivität von 2900 MU erreicht, die bei Zucht auf Glycerin um den Faktor 1,6 niedriger war. Die Standardabweichung war in beiden Fällen sehr hoch; das Verhältnis der Aktivitäten zueinander innerhalb einer Zuchtreihe blieb aber stabil.

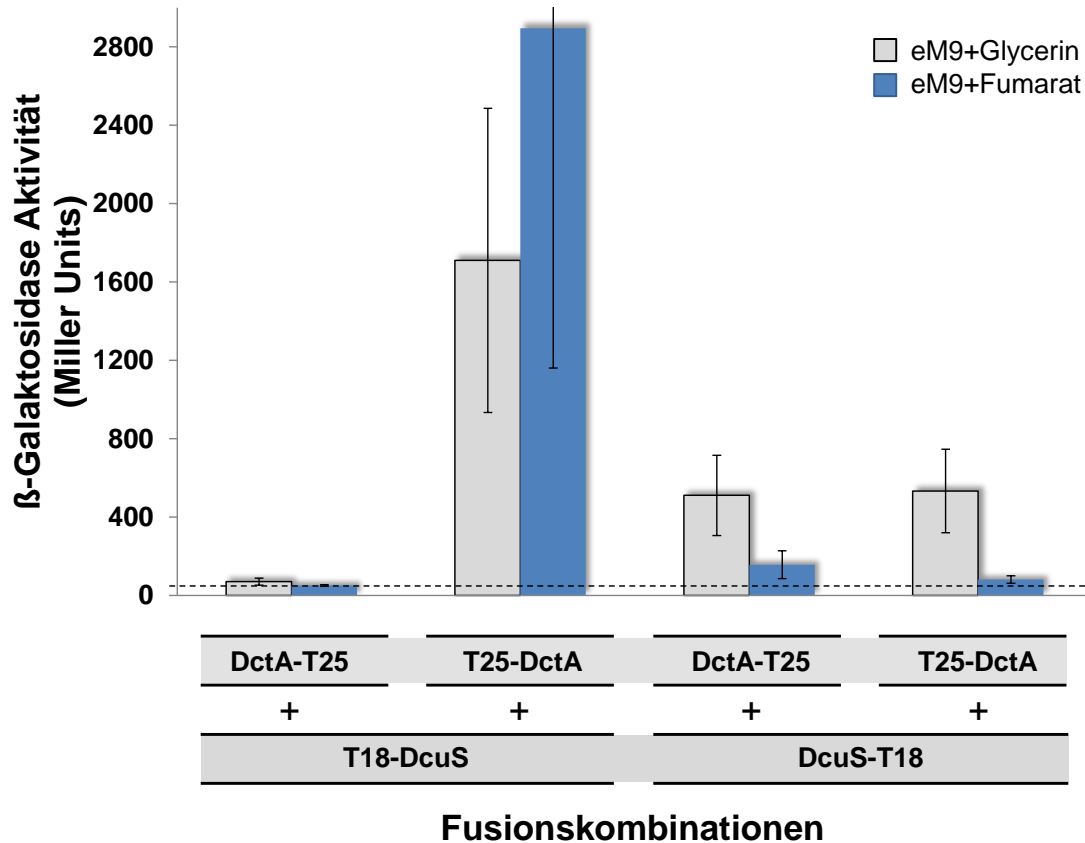


Abb. 36: **Fumaratabhängigkeit der Interaktion von DctA mit DcuS in verschiedenen Fusionskombinationen (Teil1)**. DctA und DcuS wurden jeweils an ihrem N- oder C-Terminus mit einem T25 oder T18-Fragment fusioniert. Alle acht möglichen Kombinationen von DctA mit DcuS wurden aerob in eM9 Medium mit Glycerin oder Fumarat gezüchtet und dann auf ihre Interaktion gemessen. DctA-Fusionen: DctA-T25 (pMW858), T25-DctA (pMW856), DcuS-T18 (pMW428), T18-DcuS (pMW429).

Ebenso war die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität von T25-DcuS/T18-DctA bei der Zucht mit Fumarat erhöht und entsprach somit nicht den Erwartungen. Es konnte auch eine Aktivität der Kombination von T25-DcuS mit DctA-T18 gemessen werden, die bei weitem nicht so hoch war wie die der N-terminalen Kombinationen, aber ebenfalls bei Zucht auf Fumarat gesteigert wurde.

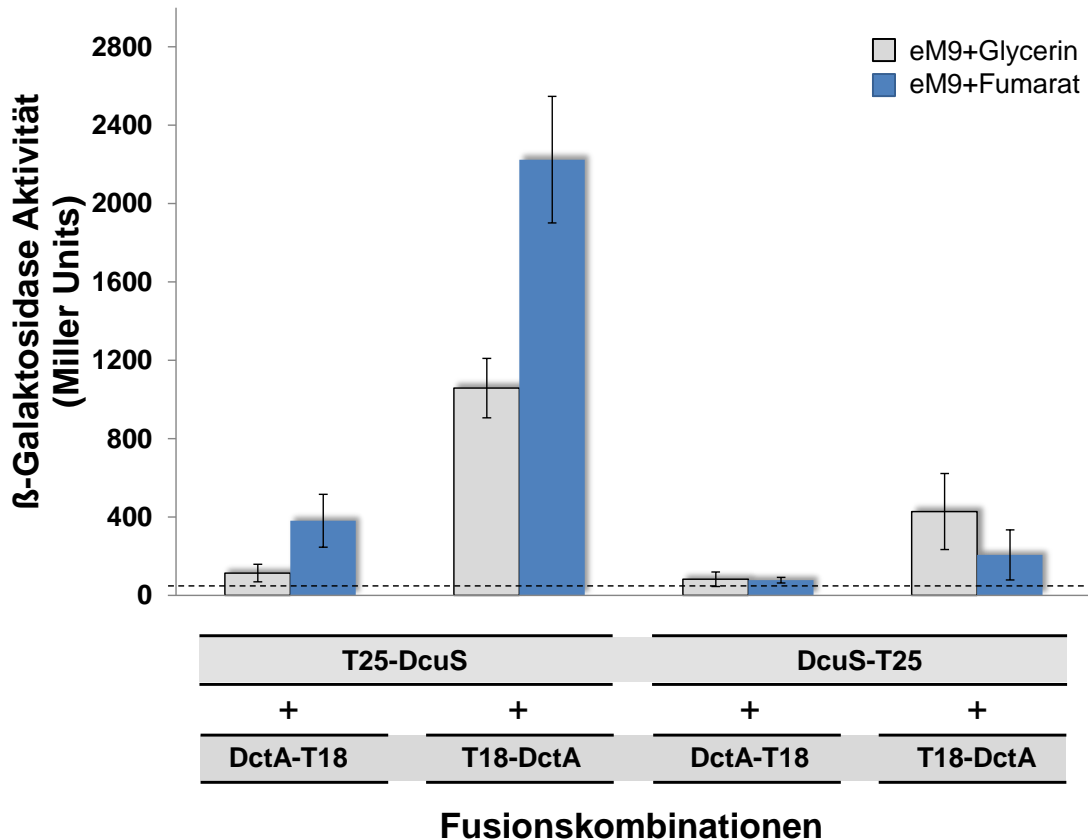


Abb. 37: **Fumaratabhängigkeit der Interaktion von DctA mit DcuS in verschiedenen Fusionskombinationen (Teil2).** DctA und DcuS wurden jeweils an ihrem N- oder C-Terminus mit einem T25- oder T18-Fragment fusioniert. Alle acht möglichen Kombinationen von DctA mit DcuS wurden aerob in eM9 Medium mit Glycerin oder Fumarat gezüchtet und dann auf ihre Interaktion gemessen. DctA-Fusionen: DctA-T18 (pMW918), T18-DctA (pMW917); DcuS-Fusionen: DcuS-T25 (pMW919), T25-DcuS (pMW426).

#### 4.6.2 Fumaratabhängigkeit der Interaktion von DctA mit DcuS-Punktmutanten

Die Interaktion von T25-DctA mit Varianten von T18-DcuS wurde nach Zucht in eM9 gemessen (Abb. 38). In der Kombination T25-DctA mit wildtypischem T18-DcuS wurde die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität durch Fumarat von 1710 MU auf 2895 MU gesteigert. Die DcuS ON-Mutante N248D zeigte keine Interaktion mit DctA (Abb. 38) und war auch in ihrer Homodimerisierung gestört (Degreif-Dünnwald, 2011). Die ON Variante N304D hatte mit Glycerin eine dem Wildtyp vergleichbare Interaktion; mit Fumarat war diese leicht reduziert. Die beiden OFF-Mutanten V276A und F221A zeigten nach Zucht auf Glycerin einen niedrigeren Wert und nach Zucht auf Fumarat einen höheren Wert als der Wildtyp. Während die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität durch Fumarat in der Wildtypkombination um den Faktor 1,7 gesteigert wurde, betrug er bei der ON-Mutante N304D nur 1,4; bei der OFF-Mutante V276A



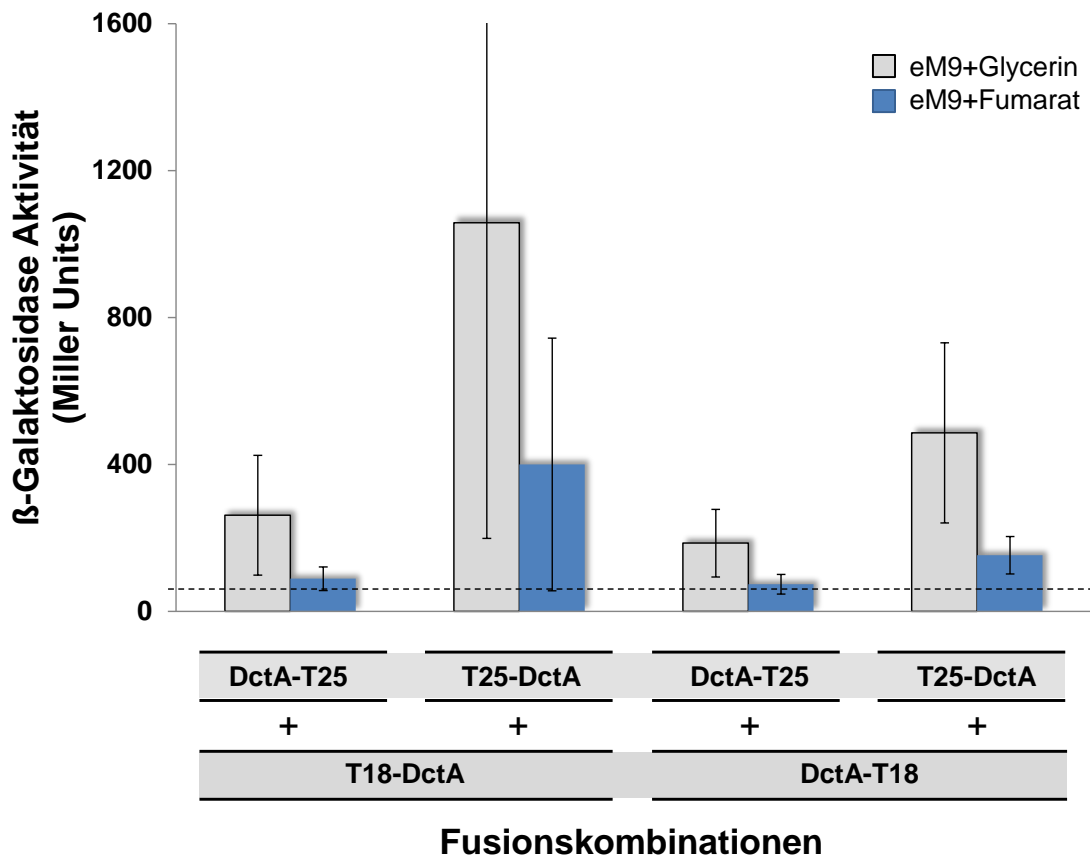


Abb. 39: **Fumaratabhängigkeit der Interaktion von DctA mit DctA in verschiedenen Fusionskombinationen.** DctA wurde jeweils an seinem N- oder C-Terminus mit einem T25- oder T18-Fragment fusioniert. Alle vier möglichen Kombinationen wurden aerob in eM9 Medium mit Glycerin oder Fumarat gezüchtet und dann auf ihre Interaktion gemessen. DctA-Fusionen: DctA-T25 (pMW858), T25-DctA (pMW856), DctA-T18 (pMW918), T18-DctA (pMW917).

Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse nicht erkennen, dass die Interaktion von DcuS und DctA, wie in Abb. 17 dargestellt, durch Fumarat aufgelöst wird. In den meisten Fällen hat Fumarat aber einen deutlichen Effekt auf die Interaktion. Es muss davon ausgegangen werden, dass Fumarat die Art der Interaktion beeinflusst, aber nicht zu einem Verlust der Interaktion führt. Ein neues Modell der Regulation wird in der Diskussion erläutert (vgl. S. 166).

## 4.7 BACTH: Interaktion von DcuS mit DcuB

### 4.7.1 Interaktion von DcuS mit DcuB

Eine Protein-Protein-Interaktion wird durch das Regulationsmodell (vgl. Abb. 17) für DcuB mit DcuS, entsprechend der DcuS-Interaktion mit DctA, vorausgesetzt. Während jedoch *dctA* nur aerob exprimiert wird, ist die Expression von *dcuB* nur anaerob zu beobachten. DcuB ließ sich kaum überexprimieren. Versuche der starken Expression von DcuB führten oftmals zum Zelltod (Bauer et al., 2011). Es wird daher vermutet, dass DcuB in hohen Konzentrationen toxisch für die Zelle ist. Zusätzlich dazu sind viele Methoden ungeeignet für die Analyse von DcuB, da sowohl N- als auch C-Terminus im Periplasma liegen (Bauer, 2010, Abb. 40). Eine cytoplasmatische Lokalisation der Reporterfusionen ist eine Grundvoraussetzung für die Untersuchung von Interaktionen mit dem BACTH-System und durch FRET. Deshalb wurden hier verschiedene C-terminal verkürzte und mit T25 fusionierte DcuB-Varianten erstellt, deren C-Terminus im Cytoplasma liegen sollte. Die Lokalisation der C-terminal verkürzten Enden wurde in einer früheren Arbeit durch die Topologie von DcuB bestimmt (Bauer et al., 2011). In dieser Arbeit wurde für Interaktionsstudien C-terminal verkürztes DcuB mit den Aminosäuren 1-211, 1-256, 1-295, 1-373, 1-412 und 1-446 mit T25 fusioniert. Alle Konstrukte bis auf DcuB<sub>1-256</sub>-T25 und DcuB<sub>1-446</sub>-T25 wiesen eine cytosolische Lokalisation ihres C-Terminus auf und sollten somit theoretisch durch das BACTH-System messbar sein. Zusätzlich wurde ein DcuB-Konstrukt erstellt, das T25 in einer großen cytosolischen Schleife in der Mitte von DcuB trägt (Abb. 40, rechts).

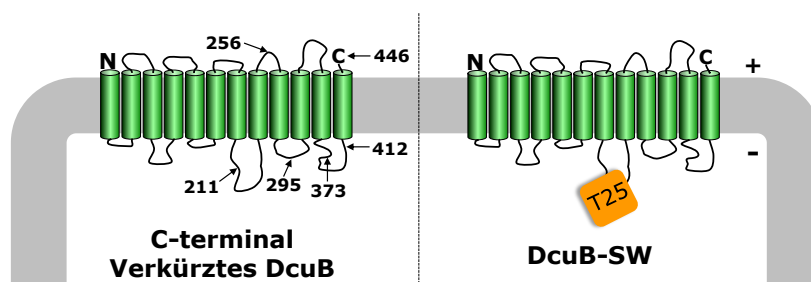


Abb. 40: Schematische Darstellung der DcuB-Konstrukte, die für Analysen im BACTH (Bacterial Two-Hybrid) System verwendet wurden. Positionen C-terminaler Verkürzungen sind mit Pfeil und der entsprechenden Aminosäureposition als Zahlenwert angegeben. Sowohl N- als auch C-Terminus liegen bei DcuB periplasmatisch. Im DcuB-Sandwich-Konstrukt (DcuB-SW, pMW1028) ist das T25-Fragment zentral in einer cytosolischen Schleife eingebaut.

Dieses Konstrukt DcuB<sub>1-211</sub>-T25-<sub>213-446</sub> oder auch DcuB-Sandwich-Konstrukt genannt, enthält Vollängen-DcuB mit dem T25-Fragment zwischen den Aminosäuren 211 und 213. Interaktionsmessungen von Vollängen T25-DcuB mit DcuS-T18 oder T18-DcuS zeigten keine messbare Interaktion, da hier das T25-Fragment im Periplasma liegt (Abb. 41). Eine N-terminale Verkürzung von DcuB um eine Transmembranhelix (T25-DcuB<sub>20-446</sub>) sollte das T25-Fragment cytosolisch tragen. Auch hier war keine Interaktion mit DcuS zu erkennen. Messungen mit dem DcuB-Sandwich-Konstrukt (DcuB-SW) plus T18-DcuS ließen jedoch eine starke Interaktion erkennen. Somit konnte die Interaktion von DcuB mit DcuS erstmals nachgewiesen werden.

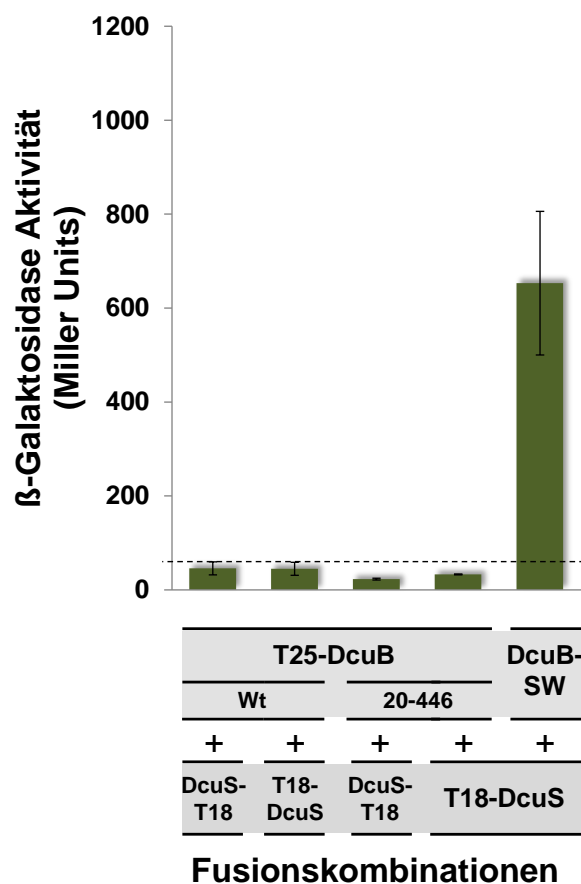


Abb. 41: **Interaktion von DcuB-Varianten mit DcuS.** Wildtypisches DcuB (T25-DcuB, pMW425) und verkürztes DcuB (T25-DcuB<sub>20-446</sub>, pMW857) wurden N-terminal mit einem T25-Fragment fusioniert. Zusätzlich wurde ein DcuB-Sandwich-Konstrukt erstellt (DcuB-SW, DcuB<sub>1-211</sub>-T25-<sub>213-446</sub>, pMW1028), das das T25-Fragment in einer großen cytoplasmatischen Schleife enthält. Die DcuB-Konstrukte wurden mit DcuS-T18 (pMW428) oder T18-DcuS (pMW429) exprimiert.

C-terminale Verkürzungen von DcuB führten nur bei der Kombination von DcuB<sub>1-211</sub> mit DcuS-T18 zu einer messbaren Interaktion (Abb. 42). Diese war jedoch mit 122 MU relativ schwach. Auch hier führte die Kombination mit dem DcuB-Sandwich-Konstrukt DcuB-SW/DcuS-T18 zu einer deutlich höheren Interaktion von 298 MU. Die Verkürzung von DcuS zu DcuS-TM2-T18 führte zu einer Verdreifachung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität auf 933 MU. Die DcuS-Punktmutation H110A (OFF) hatte keinen Effekt auf die Interaktionsstärke im Vergleich zum Wildtyp.

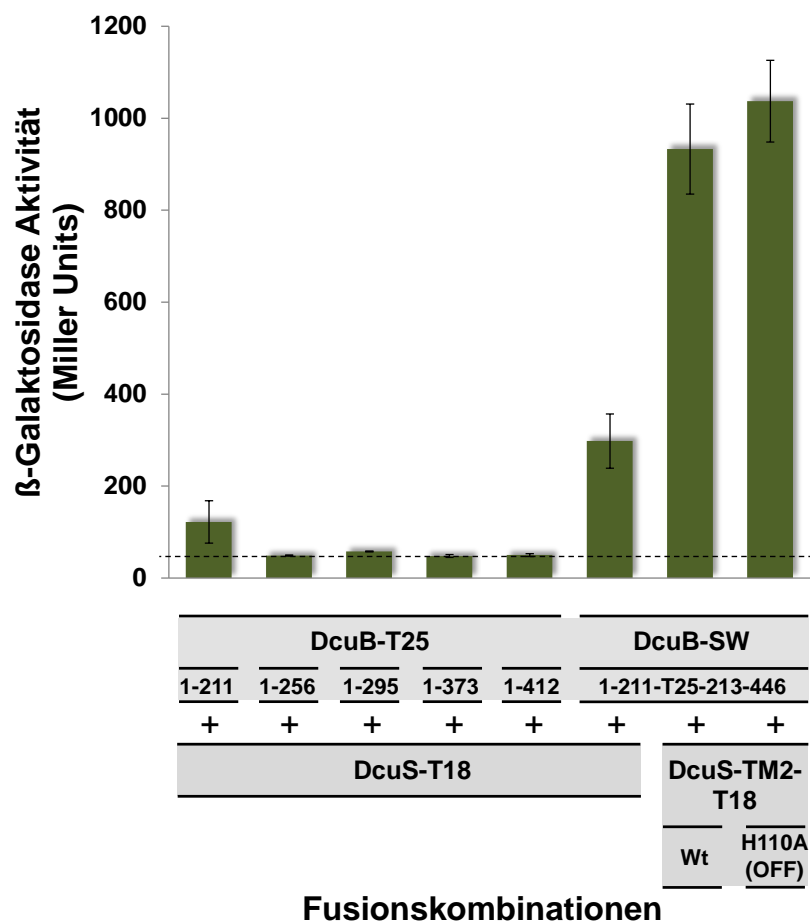


Abb. 42: **Interaktion von DcuB-Varianten mit DcuS oder DcuS-Varianten.** Verkürztes DcuB wurde jeweils an seinem C-Terminus mit einem T25-Fragment fusioniert. Zusätzlich wurde ein DcuB-Sandwich-Konstrukt erstellt (DcuB-SW, DcuB<sub>1-211</sub>-T25-<sub>213-446</sub>, pMW1028), das das T25-Fragment in einer großen cytoplasmatischen Schleife enthält. Die DcuB-Konstrukte wurden mit DcuS-T18 (pMW428) oder der verkürzten Variante (DcuS-TM2-T18, pMW948) und einer Punktmutante (DcuS-TM2<sub>H110A</sub>-T18, pMW980) exprimiert. DcuB-Varianten: DcuB<sub>1-211</sub>-T25 (pMW1027), DcuB<sub>1-256</sub>-T25 (pMW1077), DcuB<sub>1-295</sub>-T25 (pMW1078), DcuB<sub>1-373</sub>-T25 (pMW1079), DcuB<sub>1-412</sub>-T25 (pMW1080).



#### 4.7.2 Regulation von DctA- bzw. DcuB-Deletionsstämmen durch plasmidkodiertes DcuB

Ähnlich wie die regulatorische Funktion von DctA durch *dctA-lacZ*-Fusionen überprüft worden war (vgl. S. 68), wurde auch die Regulationskomplementation von DcuB durch *dcuB-lacZ* Fusionen getestet. Im Wildtyp (Wt) wurde die Expression von *dcuB* anaerob durch Fumarat um den Faktor 31 stimuliert (Abb. 43). In einer DcuB-negativen Mutante (DcuB<sup>-</sup>) war die *dcuB-lacZ* Expression konstitutiv, also schon in der Abwesenheit des Effektors Fumarat maximal und nicht mehr durch Fumarat induzierbar. Ähnlich wie zuvor wurde versucht, die chromosomale Deletion durch plasmidkodiertes DcuB zu komplementieren. Dazu wurden die im BACTH-System eingesetzten Plasmide kodierend für T25-DcuB, T25-DcuB<sub>20-446</sub> und DcuB<sub>1-211</sub>-T25-<sub>213-446</sub> im DcuB-negativen Stamm IMW503 mit einer *dcuB-lacZ* Promotorfusion exprimiert. Die Komplementation durch T25-DcuB stellte die Regulation wieder her. Der Induktionsfaktor war mit 8 zwar nicht so hoch wie der des Wildtyps, das Expressionsmuster entsprach aber dem wildtypischen. Die N-terminal verkürzte Variante T25-DcuB<sub>20-446</sub> konnte hingegen nicht komplementieren und zeigte ein Expressionsmuster in  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität und einen Induktionsfaktor vergleichbar mit der unkomplementierten Mutante. Vermutlich wurde die N-terminal verkürzte DcuB Fusion nicht stabil in die Membran eingebaut, weshalb sie nicht komplementierte und auch keine Interaktion mit DcuS zeigte (vgl. Abb. 41). Das DcuB-Sandwich-Konstrukt (DcuB<sub>1-211</sub>-T25-<sub>213-446</sub>) hatte durch die Anwesenheit von Fumarat einen Induktionsfaktor von 11 und war somit regulatorisch aktiv. Allerdings zeigte es nicht die absoluten Aktivitäten des Wildtyps oder die der Deletionsmutante. So betrug die Aktivität bei der Anwesenheit von Fumarat nur ein Achtel von der des Wildtyps. Möglicherweise bindet DcuB im Sandwich-Konstrukt dauerhaft und fester an DcuS, so dass eine permanente negative Regulation der DcuS-Zielgene entsteht. Außerdem konnte das Wachstum nicht durch das DcuB-Sandwich-Konstrukt komplementiert werden (Daten nicht gezeigt).

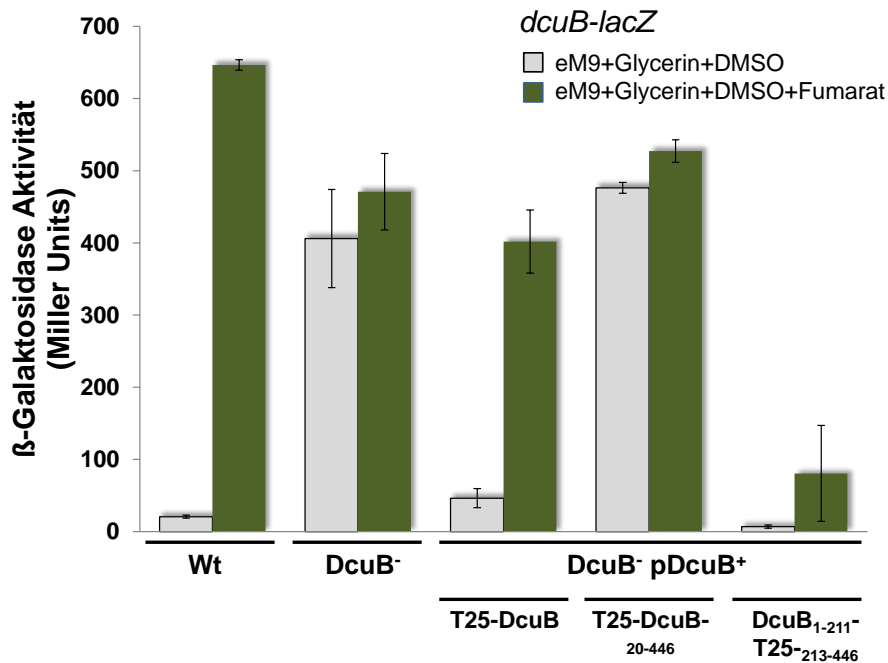


Abb. 43: **Genexpression von *dcuB-lacZ* in einem *DcuB*-negativen Stamm und Komplementation durch plasmidkodierte *DcuB* (pDcuB<sup>+</sup>).** Gemessen wurde nach anaerober Zucht in eM9 mit Glycerin und DMSO mit (grün) oder ohne (hellgrau) Fumarat in dem Wildtyp (Wt, IMW237) und in einer *DcuB*-negativen Mutante (*DcuB*<sup>-</sup>, IMW503). Die Komplementation durch plasmidkodierte *DcuB* Fusionsplasmide T25-*DcuB* (pMW425), T25-*DcuB*<sub>20-446</sub> (pMW857) und *DcuB*<sub>1-211</sub>-T25<sub>213-446</sub> (pMW1028) erfolgte ohne zusätzliche Induktion.

Plasmidkodierte DctA ist in der Lage, die regulatorische Funktion von *DcuS* in einem *DcuB*-negativen Stamm zu komplementieren (vgl. Abb. 57). Ebenso wurde hier versucht, mit plasmidkodiertem *DcuB* die *DcuS*-Funktion in einem *DctA*-negativen Stamm zu komplementieren. Hierzu wurden die induzierbaren Plasmide pMW697 und pMW619 verwendet. Frühere Versuche zeigten, dass diese Plasmide eine *DcuB*-Deletion größtenteils komplementieren konnten (Witan, Diplomarbeit; Abb. A2). Die aerobe Komplementation einer *DctA*-negativen Mutante war jedoch nicht erfolgreich (Abb. 44). Die *dctA-lacZ* Aktivität entsprach mit und ohne Fumarat der Aktivität der *DctA*-negativen Mutante. Auch verschiedene Expressionsstärken der Plasmide führten zu keiner Komplementation (Abb. A2, Abb. A3). Ferner konnte das aerobe Wachstum einer *DctA*-negativen Mutante mit Fumarat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nicht durch den Fumarat/Succinat-Antiporter *DcuB* komplementiert werden (Abb. A4).

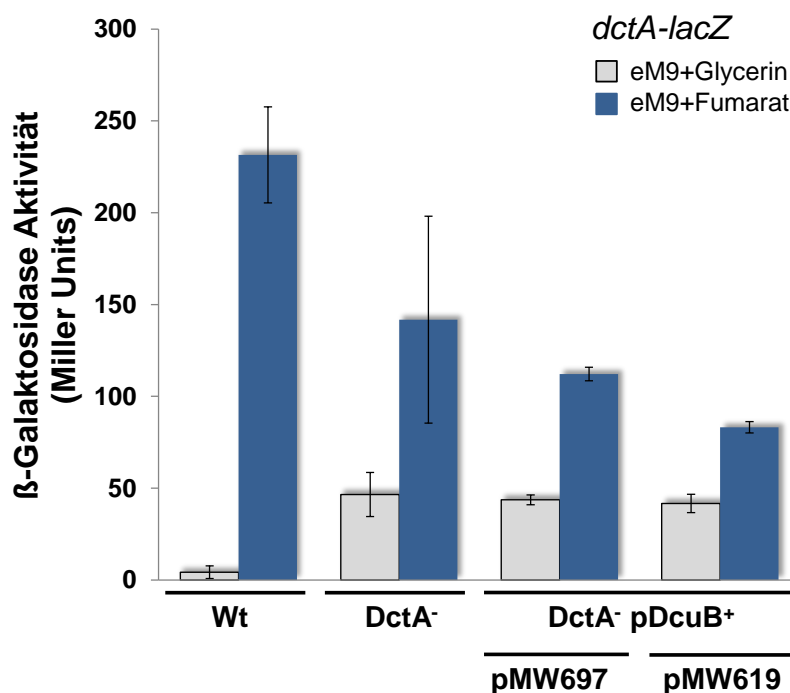


Abb. 44: **Genexpression von *dctA-lacZ* in einem DctA-negativen Stamm und Komplementation durch plasmidkodiertes DcuB (pDcuB<sup>+</sup>)**. Gemessen wurde nach aerober Zucht in eM9 plus Fumarat (dunkelblau) oder Glycerin (grau) mit dem Wildtyp (Wt, IMW385) und der DctA-negativen Mutante (DctA<sup>-</sup>, IMW386). Plasmidkodiertes DcuB (pDcuB<sup>+</sup>) wurde mit verschiedenen Vektoren (pMW697, pMW619) exprimiert, um die DctA-Deletion zu komplementieren.

#### 4.8 BACTH: Interaktion von DctA mit DctA (Homodimerisierung)

Homologe von DctA aus *E. coli* und andere Proteine der DAACS-Transporterfamilie weisen eine trimere Quartärstruktur auf (Gendreau et al., 2004). Es sollte untersucht werden, ob DctA ebenfalls Homooligomere bildet und wie sich Veränderungen von DctA durch Verkürzung oder Punktmutation auf diese Interaktion auswirken.

##### 4.8.1 Interaktion von DctA-Fusionsproteinen

Die Homooligomerisierung von DctA wurde mit vier Fusionskombinationen getestet (Abb. 45). In allen vier möglichen Kombinationen (DctA-T25/T18-DctA, T25-DctA/DctA-T18, T25-DctA/T18-DctA, DctA-T25/DctA-T18) wurde eine Interaktion durch blaue Kolonien (Tab. 17) und eine β-Galaktosidaseaktivität von über 55 Miller Units beobachtet. DctA bildete somit mindestens Homodimere. Es war außerdem eine Abhängigkeit der β-Galaktosidaseaktivität von den verwendeten Interaktionstermini zu sehen. Diese erklärt sich durch die unterschiedliche Lage der T25- und T18-Fusionen relativ zueinander. Während die C-

terminalen DctA-Fusionen kombiniert (DctA-T25/DctA-T18) nur eine Aktivität von 165 MU bildeten, besaßen N-terminale Fusionen (T25-DctA/T18-DctA) eine Aktivität von 604 MU.

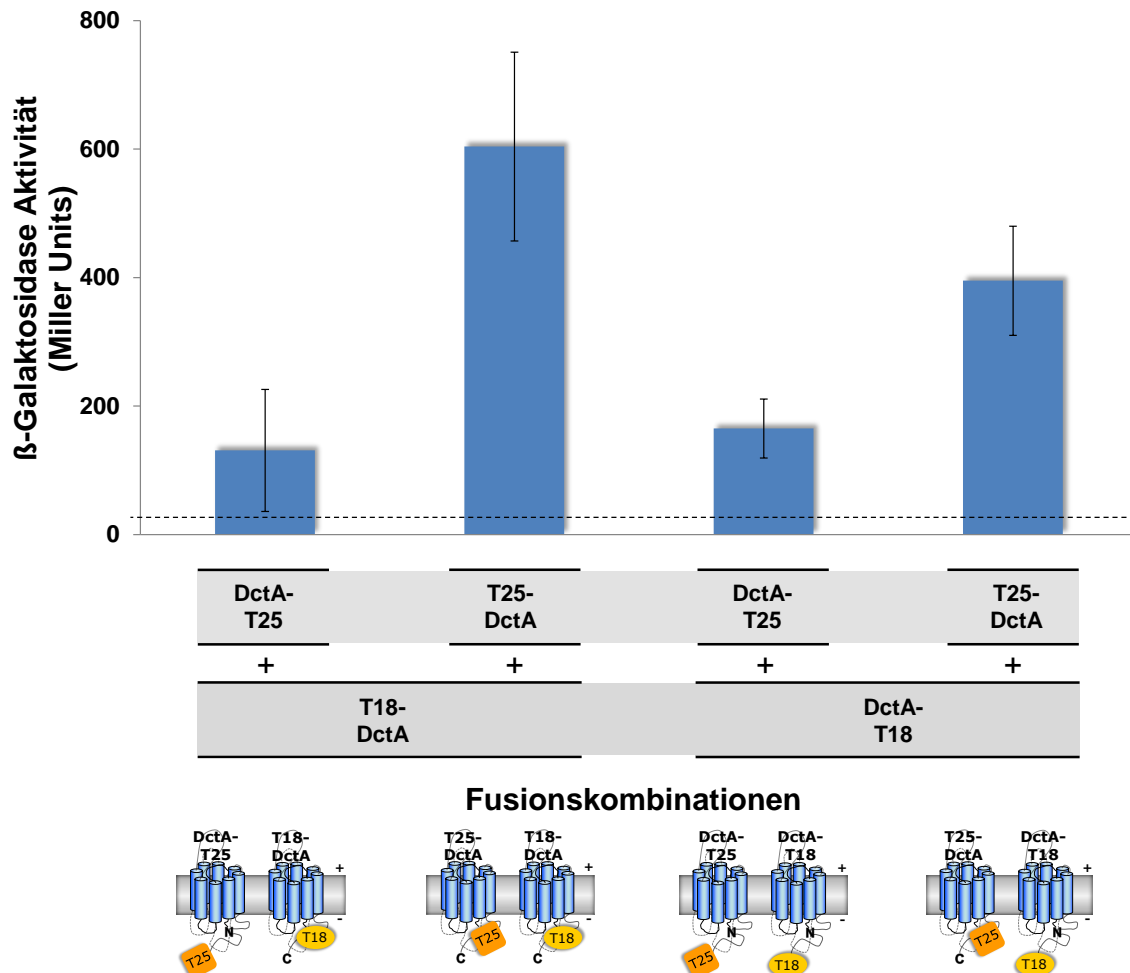


Abb. 45: **Interaktion von DctA mit DctA in verschiedenen Fusionskombinationen.** DctA wurde jeweils an seinem N- oder C-Terminus mit einem T25- oder T18-Fragment fusioniert. Alle vier möglichen Kombinationen wurden danach in BTH101 auf ihre Interaktion gemessen. DctA-Fusionen: DctA-T25 (pMW858), T25-DctA (pMW856), DctA-T18 (pMW918), T18-DctA (pMW917).

#### 4.8.2 Funktionskontrolle der DctA-T25- und T18-Fusionsproteine

Die im BACTH-System verwendeten DctA-Fusionen wurden auf ihre Funktionalität überprüft. DctA ist der einzige bekannte aerobe Transporter von C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren in *E. coli*. Die chromosomale Deletion von *dctA* führte zu einem fast vollständigen Wachstumsverlust in eM9 Minimalmedium mit Fumarat als Kohlenstoff- und Energiequelle (Abb. 46). Durch Expression von plasmidkodiertem DctA der verschiedenen Plasmide des BACTH-Systems konnte mit allen DctA-kodierenden Plasmiden eine Wachstumskomplementation erreicht

werden (Abb. 46). Stämme, die mit T25-Fusionsproteinen komplementiert wurden, wuchsen dabei besser als der Wildtyp, aber auch T18-Fusionsproteine konnten ein Wachstum wiederherstellen.

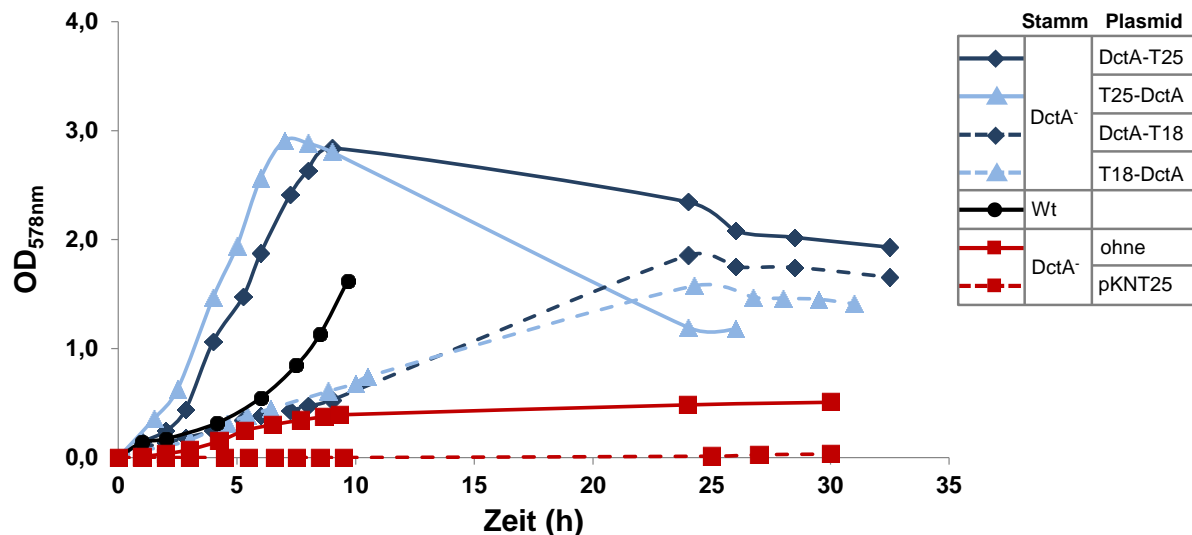


Abb. 46: **Wachstumskomplementation eines DctA-negativen Stamms (DctA<sup>-</sup>, MDO800) durch wildtypische DctA-Fusionsproteine des BACTH-Systems.** Es wurden DctA-T25 (pMW858), T25-DctA (pMW856), DctA-T18 (pMW918) und T18-DctA (pMW917) exprimiert. Die Zucht erfolgte aerob in eM9 plus 50 mM Fumarat. Als Positivkontrolle diente der Wildtypstamm AN387. Die unkomplementierte oder mit leerem pKNT25 Plasmid komplementierte DctA<sup>-</sup> Mutante MDO800 diente als Negativkontrolle.

#### 4.8.3 Interaktion von C-terminal verkürzten DctA-Varianten

Um die Homooligomerisierung von DctA genauer zu charakterisieren und Aufschlüsse über die Topologie von DctA zu erhalten, wurde eine Serie von C-terminal verkürzten Konstrukten hergestellt (Abb. 47). Dabei wurde DctA nach verschiedenen Aminosäuren (215, 250, 323, 350, 380, 403, 413, 415, 420, 428) abgeschnitten und an der letzten Aminosäure mit T25 oder T18 fusioniert. Für eine positive Reaktion im BACTH-System muss eine Oligomerisierung erfolgen; außerdem müssen die T25- und T18-Fragmente im Cytoplasma lokalisiert sein. Verschiedene verkürzte DctA-Varianten wurden auf ihre Fähigkeit zur Homooligomerisierung getestet (Abb. 48, Abb. A7).



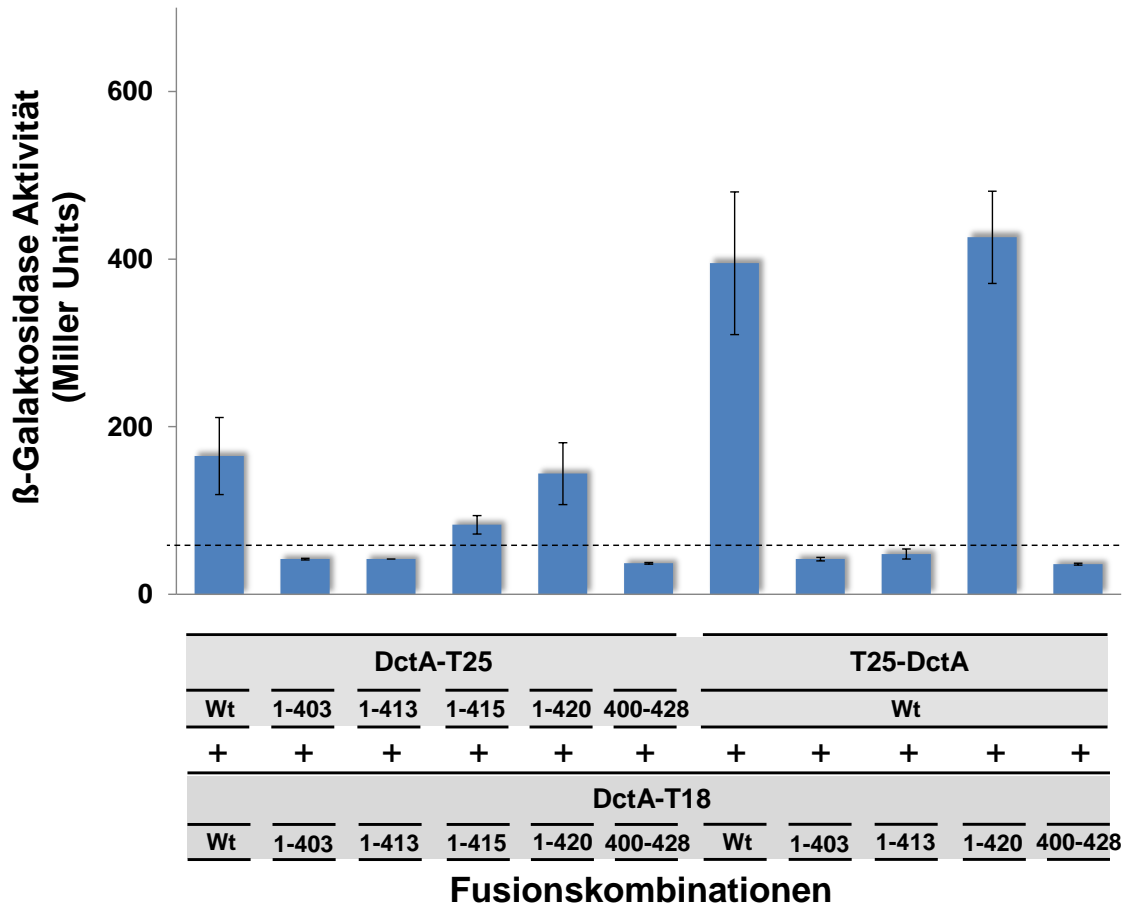


Abb. 48: **Interaktion von verschiedenen C-terminal verkürzten oder wildtypischen DctA-Fusionen mit wildtypischem oder verkürztem DctA-T18. DctA wurde C-terminal verkürzt mit T25 fusioniert und mit ebenso verkürzten DctA-T18 Varianten kombiniert.** DctA-Plasmide: DctA<sub>1-403</sub>-T25 (pMW1175), DctA<sub>1-413</sub>-T25 (pMW1176), DctA<sub>1-415</sub>-T25 (pMW1303), DctA<sub>1-420</sub>-T25 (pMW1177), DctA<sub>400-428</sub>-T25 (pMW1126), DctA<sub>1-403</sub>-T18 (pMW1178), DctA<sub>1-413</sub>-T18 (pMW1179), DctA<sub>1-415</sub>-T18 (pMW1392), DctA<sub>1-420</sub>-T18 (pMW1180), DctA<sub>400-428</sub>-T18 (pMW1227).

#### 4.8.4 Funktionskontrolle der verkürzten DctA-T25- und T18-Fusionsproteine

Die Funktionalität im Transport wurde in den verkürzten DctA-Varianten durch Wachstumskomplementation in einem DctA-negativen Stamm überprüft. Die verkürzte Variante DctA<sub>1-420</sub>-T25 komplementierte ebenso gut wie das Vollängen Konstrukt DctA-T25. Das Fusionsprotein DctA<sub>1-420</sub>-T25, das noch eine geringe Interaktion zeigte, wies auch eine deutliche Wachstumsverzögerung auf, wuchs aber nach 30 Stunden auf eine vergleichbare maximale OD<sub>578nm</sub> wie DctA-T25 nach 12 Stunden (OD<sub>578nm</sub> = 3,8). Eine weitere Verkürzung zu DctA<sub>1-413</sub> und DctA<sub>1-403</sub> führte zu einer schrittweisen Verschlechterung der Wachstumskomplementation sowohl hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit als auch hinsichtlich der maximal erreichten optischen Dichte. Das Wachstum lag aber in allen Fällen noch deutlich über dem der Negativkontrolle.

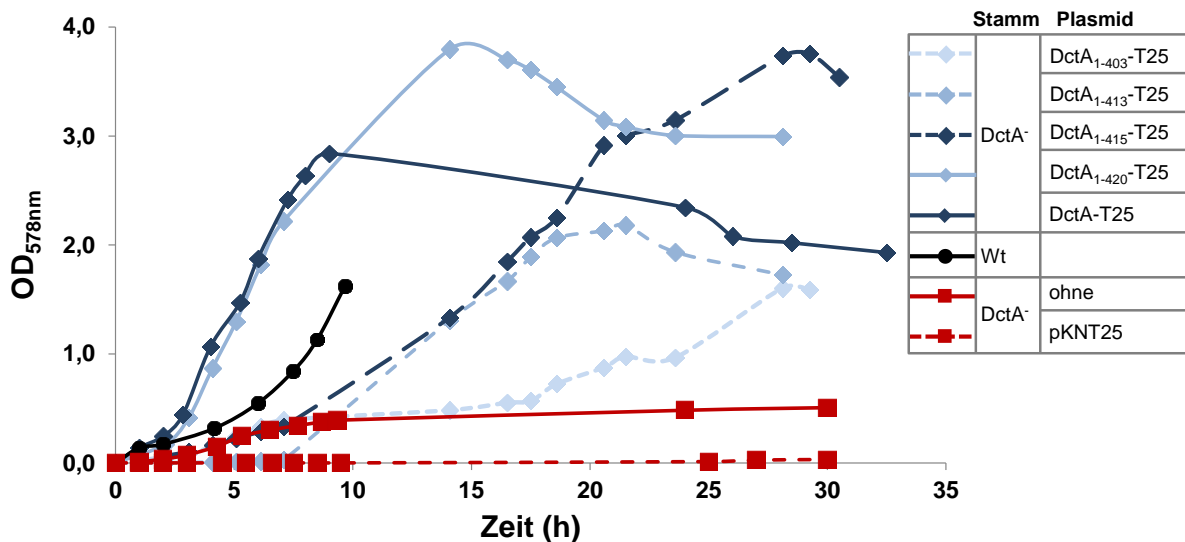


Abb. 49: Wachstumskomplementation eines DctA-negativen Stamms (DctA<sup>-</sup>, MDO800) durch verkürzte DctA-T25-Fusionsproteine des BACTH-Systems. Es wurden DctA-T25 (pMW858) und C-terminal verkürzte DctA-T25-Fusionen exprimiert: DctA<sub>1-403</sub>-T25 (pMW1175), DctA<sub>1-413</sub>-T25 (pMW1176), DctA<sub>1-415</sub>-T25 (pMW1303), DctA<sub>1-420</sub>-T25 (pMW1177). Die Zucht erfolgte aerob in eM9 + 50 mM Fumarat. Als Positivkontrolle diente der Wildtypstamm AN387. Die unkomplementierte oder mit leerem pKNT25 Plasmid komplementierte Mutante MDO800 diente als Negativkontrolle.

#### 4.8.5 Interaktion von DctA-Punktmutanten mit DctA

Es wurden verschiedene Punktmutanten von DctA durch gerichtete Mutagenese erstellt. Ein Mutationsort war in einer vermutlich für die Trimerisierung wichtigen Transmembranhelix (G92A, Austausch von Glycin gegen Alanin), ein anderer lag an einer für die Substratbindung wichtigen Position (T305A, Austausch von Threonin gegen Alanin).

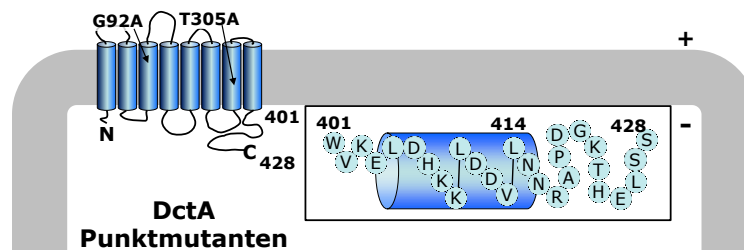
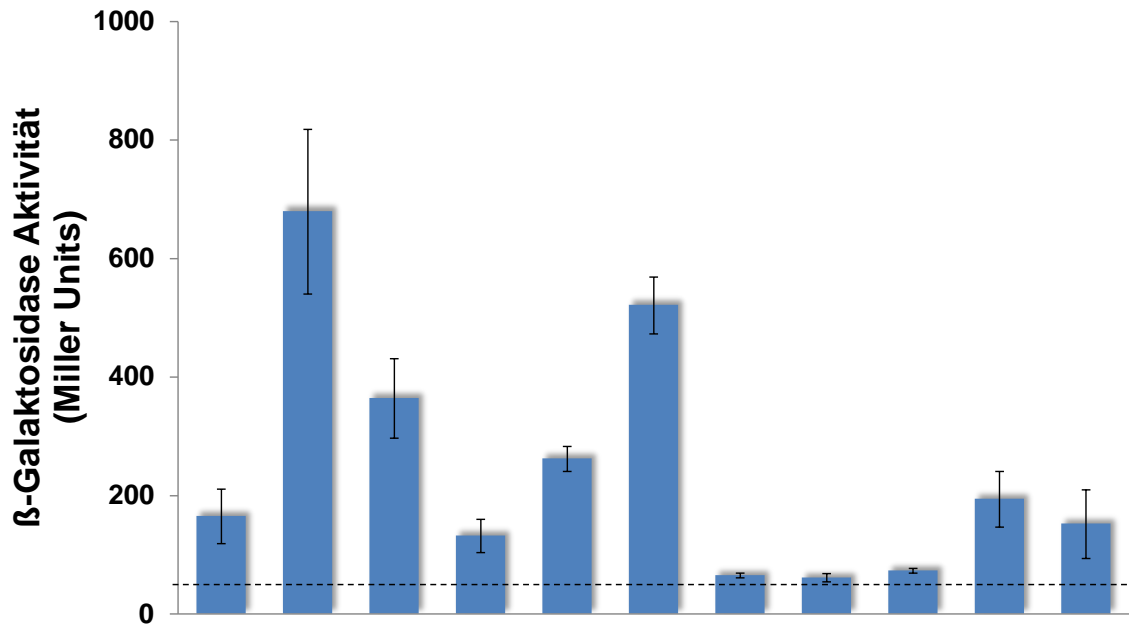


Abb. 50: Schematische Darstellung der DctA-Punktmutanten, die für Analysen im BACTH (Bacterial Two-Hybrid) System verwendet wurden. Positionen einzelner Aminosäuren sind als Zahlenwert angegeben. Die Aminosäuren des cytoplasmatischen C-Terminus sind im Einbuchstabencode angegeben.



Die anderen Mutanten wurden auf die für Interaktion und Wachstum wichtige C-terminale Region von DctA im Bereich der Aminosäuren 400-420 (Abb. 50) konzentriert. Es wurden verschiedene Fusionskombinationen von mutiertem und wildtypischem DctA kombiniert. Einzelne Aminosäuren wurden immer gegen Alanin (A) ausgetauscht, es sei denn die ursprüngliche Aminosäure war Alanin, dann wurde diese gegen Serin (S) getauscht. Um einen Überblick über mögliche Interaktionen zu erhalten, wurden alle Einzelmutanten in DctA-T25 und DctA-T18 eingebracht und jeweils ein einheitlich an einer Stelle mutiertes DctA erhalten (z. B. DctA<sub>G92A</sub>-T25 kombiniert mit DctA<sub>G92A</sub>-T18). Eine Übersicht der Ergebnisse dieser Kombinationen ist in Abb. 51 dargestellt. Wildtypische Kombination von DctA-T25 und DctA-T18 ergab eine Aktivität von 165 MU. Die beiden nicht am C-Terminus lokalisierten Punktmutanten G92A bzw. T305A zeigten eine um Faktor 4 bzw. Faktor 2,2 erhöhte Interaktion (Abb. 51). Von den am cytosolischen C-Terminus gelegenen Aminosäuren erreichten lediglich E404A und V413A eine deutlich erhöhte Interaktion (Abb. 51). Die Punktmutanten W401A, V402A, D411A, D412A, N415A, N416A, R417A, A418S, P419A und D420A wiesen eine Interaktion vergleichbar mit dem Wildtyp auf. Eine stark verringerte Interaktion wurde bei L405A, D406A, L410A und L414I gemessen. Mutation von L414S und L414A führten zu einem kompletten Verlust der Interaktion.

Die Kombination von wildtypischem DctA-T25 mit punktmutiertem DctA-T18 (Abb. 52) führte zu einer ähnlichen Interaktion wie die Kombination zweier mutierter C-terminal fusionierter DctA-Varianten. Die Aktivität näherte sich hierbei der DctA-T25 und DctA-T18 Wildtyp Kombination an. So halbierte sich die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität für E404 fast, lag aber noch über der rein wildtypischen Kombination. Für die meisten in der Interaktion reduzierten Varianten erhöhte sich die Aktivität dementsprechend leicht. Für L405A beispielsweise stieg die Aktivität von 65 MU auf 102 MU. Punktmutanten, die vorher eine wildtypische Interaktionsaktivität zeigten, wiesen auch eine wildtypische Aktivität in Kombination mit wildtypischem DctA auf.

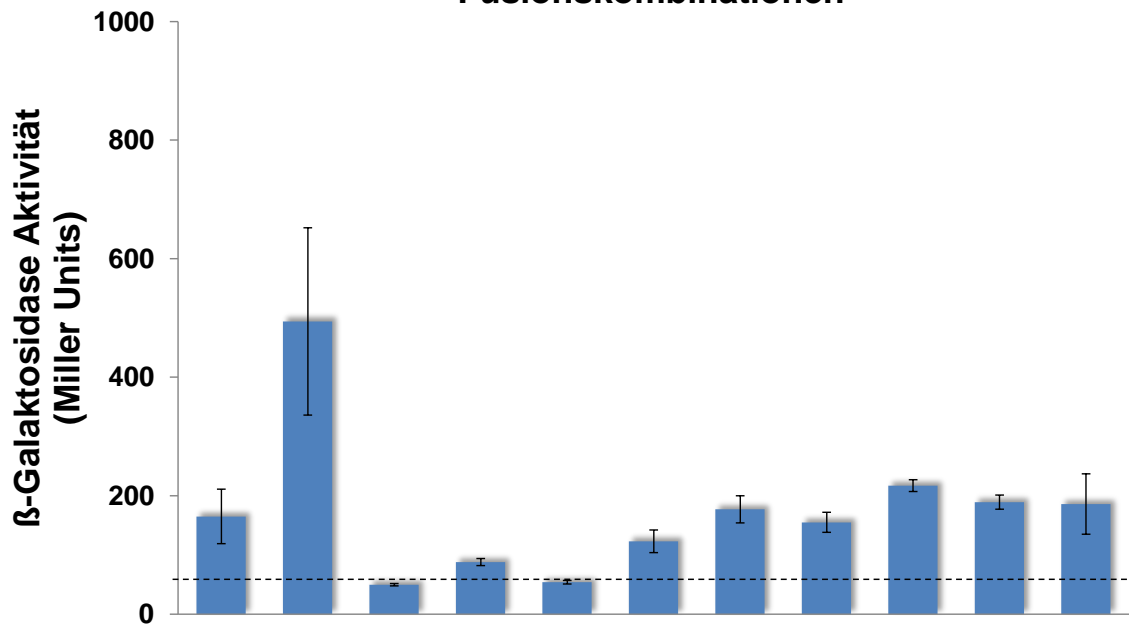


DctA-T25										
Wt	G92A	T305A	W401A	V402A	E404A	L405A	D406A	L410A	D411A	D412A
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

DctA-T18										
Wt	G92A	T305A	W401A	V402A	E404A	L405A	D406A	L410A	D411A	D412A
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### Fusionskombinationen



DctA-T25										
Wt	V413A	L414S	L414I	L414A	N415A	N416A	R417A	A418S	P419A	D420A
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

DctA-T18										
Wt	V413A	L414S	L414I	L414A	N415A	N416A	R417A	A418S	P419A	D420A
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### Fusionskombinationen

Abb. 51: **Interaktion von DctA-T25 Punktmutanten mit DctA-T18 Punktmutanten.** Bei DctA-T25 (pMW858) wurden einzelne Aminosäuren mutiert und die resultierenden Varianten mit den entsprechenden Punktmutanten von DctA-T18 (pMW918) kombiniert. DctA-Varianten: DctA<sub>G92A</sub>-T25 (pMW1463), DctA<sub>T305A</sub>-T25 (pMW1462), DctA<sub>W401A</sub>-T25 (pMW1524), DctA<sub>V402A</sub>-T25 (pMW1525), DctA<sub>E404A</sub>-T25 (pMW1344), DctA<sub>L405A</sub>-T25- (pMW1345), DctA<sub>D406A</sub>-T25 (pMW1346), DctA<sub>L410A</sub>-T25 (pMW1347), DctA<sub>D411A</sub>-T25 (pMW1457), DctA<sub>D412A</sub>-T25 (pMW1458); DctA<sub>G92A</sub>-T18 (pMW1470), DctA<sub>T305A</sub>-T18 (pMW1469), DctA<sub>W401A</sub>-T18 (pMW1528), DctA<sub>V402A</sub>-T18 (pMW1529), DctA<sub>E404A</sub>-T18 (pMW1347-2), DctA<sub>L405A</sub>-T18 (pMW1348), DctA<sub>D406A</sub>-T18 (pMW1349), DctA<sub>L410A</sub>-T18 (pMW1350), DctA<sub>D411A</sub>-T18 (pMW1464), DctA<sub>D412A</sub>-T18 (pMW1465), DctA<sub>V413A</sub>-T25 (pMW1459), DctA<sub>L414S</sub>-T25 (pMW1460), DctA<sub>L414I</sub>-T25 (pMW1461), DctA<sub>L414A</sub>-T25 (pMW1257), DctA<sub>N415A</sub>-T25 (pMW1258), DctA<sub>N416A</sub>-T25 (pMW1259), DctA<sub>R417A</sub>-T25 (pMW1260), DctA<sub>A418S</sub>-T25 (pMW1261), DctA<sub>P419A</sub>-T25 (pMW1262), DctA<sub>D420A</sub>-T25 (pMW1263); DctA<sub>V413A</sub>-T18 (pMW1466), DctA<sub>L414S</sub>-T18 (pMW1467), DctA<sub>L414I</sub>-T18 (pMW1468), DctA<sub>L414A</sub>-T18 (pMW1264), DctA<sub>N415A</sub>-T18 (pMW1265), DctA<sub>N416A</sub>-T18 (pMW1266), DctA<sub>R417A</sub>-T18 (pMW1267), DctA<sub>A418S</sub>-T18 (pMW1268), DctA<sub>P419A</sub>-T18 (pMW1269), DctA<sub>D420A</sub>-T18 (pMW1270).

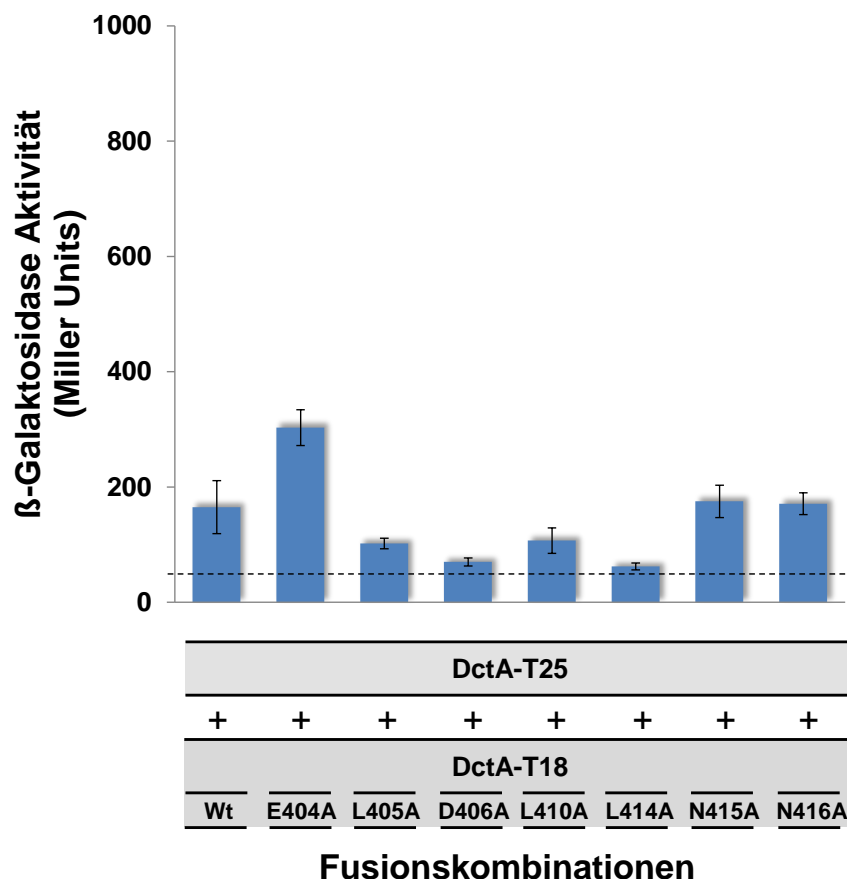


Abb. 52: **Interaktion von wildtypischem DctA-T25 mit DctA-T18 Punktmutanten.** Bei DctA-T18 (pMW918) wurden einzelne Aminosäuren mutiert und die resultierenden Varianten mit DctA-T25 (pMW858) kombiniert. DctA-Varianten: DctA<sub>E404A</sub>-T18 (pMW1347-2), DctA<sub>L405A</sub>-T18 (pMW1348), DctA<sub>D406A</sub>-T18 (pMW1349), DctA<sub>L410A</sub>-T18 (pMW1350), DctA<sub>L414A</sub>-T18 (pMW1264), DctA<sub>N415A</sub>-T18 (pMW1265), DctA<sub>N416A</sub>-T18 (pMW1266).

Die Kombination von wildtypischem DctA-T18 mit punktmutiertem DctA-T25 (Abb. 53, Abb. 52) verhielt sich dementsprechend. Da alle bisher gemessenen Kombinationen von Mutanten C-terminal fusioniert wurden, konnte ein lokaler Effekt der Strukturänderung nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurden die zwei in den C-terminalen Fusionen negativen Interaktionsmutanten D406A und L414A auch in N-terminalen Fusionen auf ihre Interaktion überprüft (Abb. 53). Beide Mutanten zeigten auch in Kombination von mutiertem T25-DctA mit mutiertem T18-DctA einen Verlust der Interaktion. Somit ist dieser nicht lokal begrenzt.

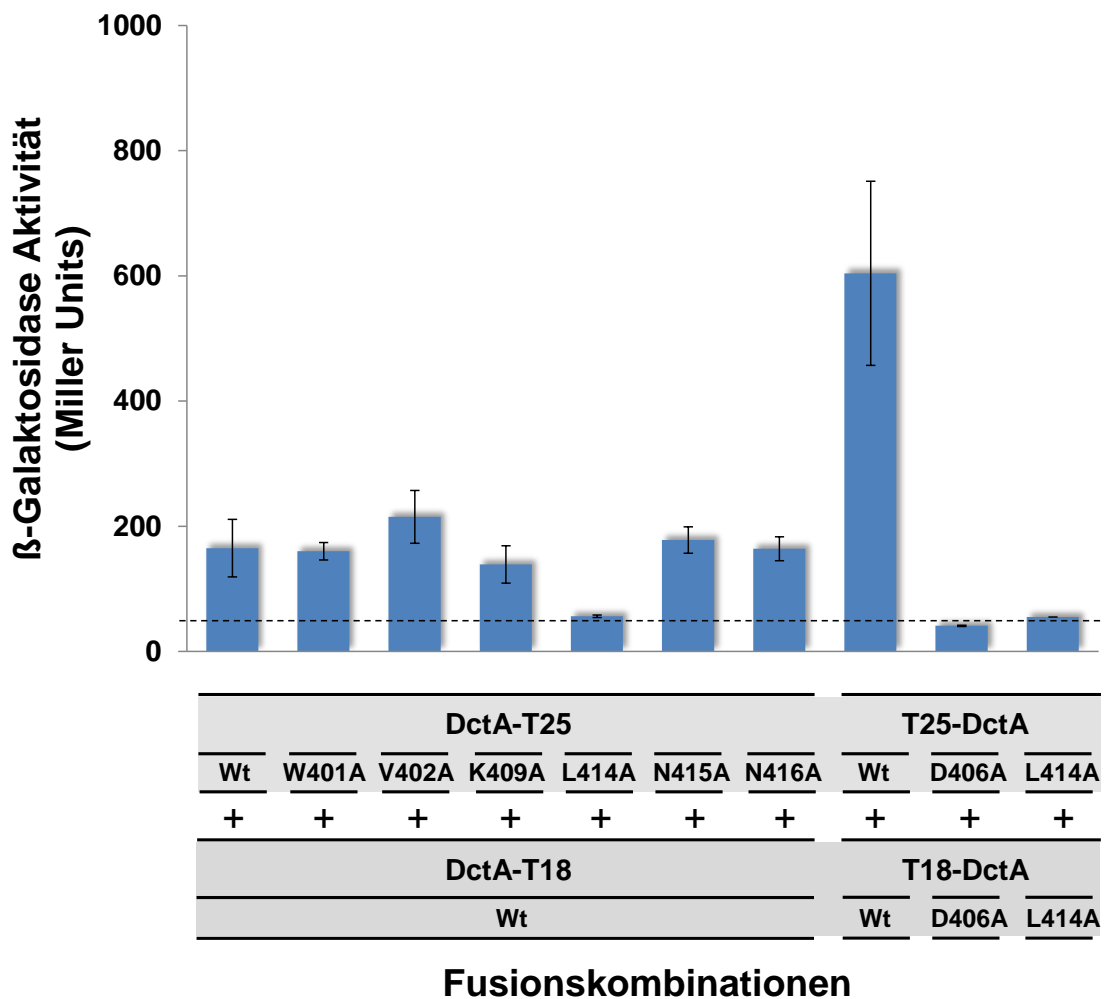


Abb. 53: **Interaktion verschiedener DctA-Punktmutanten.** Es wurden einzelne Aminosäuren von DctA mutiert und die resultierenden Varianten mit den entsprechenden Punktmutanten von DctA oder wildtypischem DctA kombiniert. DctA-Varianten: DctA<sub>W401A</sub>-T25 (pMW1524), DctA<sub>V402A</sub>-T25 (pMW1525), DctA<sub>K409A</sub>-T25 (pMW1527), DctA<sub>L414A</sub>-T25 (pMW1257), DctA<sub>N415A</sub>-T25 (pMW1258), DctA<sub>N416A</sub>-T25 (pMW1259), T25-DctA<sub>D406A</sub> (pMW1478), T25-DctA<sub>L414A</sub> (pMW1479); T18-DctA<sub>D406A</sub> (pMW1480), T18-DctA<sub>L414A</sub> (pMW1481).

## 4.8.6 Funktionskontrolle von DctA-Einzelmutanten

Einige wichtige Punktmutanten von DctA-T25 wurden auf ihre Transportfunktion durch Wachstumskomplementation überprüft. Die Einzelmutante N415A, die eine wildtypische Interaktion zeigte, komplementierte vergleichbar zu wildtypischem DctA-T25. Die interaktionsnegative Mutante L414A wies, ebenso wie die in der Interaktion wildtypische Mutante N416A, ein stark beeinträchtigt Wachstum auf.

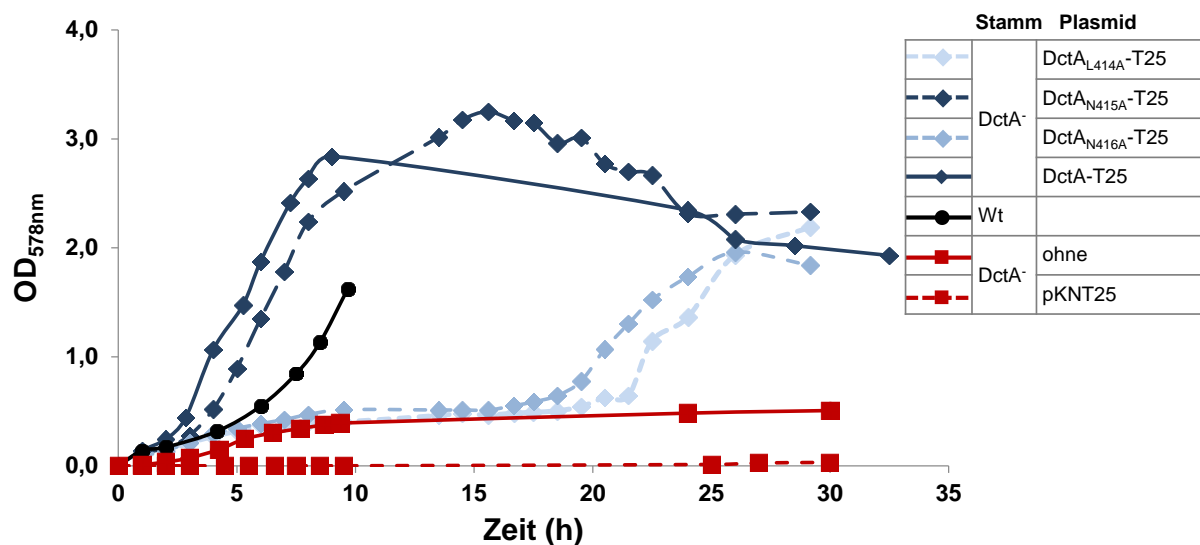


Abb. 54: Wachstumskomplementation eines DctA-negativen Stamms (DctA<sup>-</sup>, MDO800) durch Punktmutanten des DctA-T25-Fusionsproteins des BACTH-Systems. Die Zucht erfolgte aerob in eM9 + 50 mM Fumarat. Wachstum der Punktmutanten DctA<sub>L414A</sub>-T25 (pMW1257), DctA<sub>N415A</sub>-T25 (pMW1258), DctA<sub>N416A</sub>-T25 (pMW1259) wurde mit dem Wildtyp DctA-T25 (pMW858) verglichen. Als Positivkontrolle diente der Wildtypstamm AN387. Die unkomplementierte oder mit leerem pKNT25 Plasmid komplementierte Mutante MDO800 diente als Negativkontrolle.

Um zu testen, ob sich die für die Überexpression hergestellten DctA-His-Plasmide und Einzelmutanten von DctA-His (vgl. S. 122) zur Wachstumskomplementation eignen, wurden ebenfalls Wachstumsversuche durchgeführt. Im Unterschied zu den BACTH-Plasmiden besitzen diese keine T25 oder T18 Fusion, sondern lediglich ein N- und C-terminales His-Tag. Als Vektor wurde das stark regulierbare Plasmid mittlerer Kopienzahl pBAD18K\* verwendet und die Induktionsstärke auf 50 µM L-Arabinose eingestellt (Abb. 55). Die DctA-Mutanten T305A, L410A, N415A, N416A, R417A, A418S, P419A und D420A wuchsen vergleichbar zu dem Wildtyp. Die Einzelmutante L405A zeigte ein etwas schlechteres Wachstum, die Mutanten E404A und L414A ein stark beeinträchtigt Wachstum. L414A war somit weder als T25-Fusion noch mit His-Tag in der Lage, Wachstum auf Fumarat zu komplementieren.

Anders als bei DctA<sub>N416A</sub>-T25 war bei DctA<sub>N416A</sub>-His keine Beeinträchtigung des Wachstums zu erkennen.

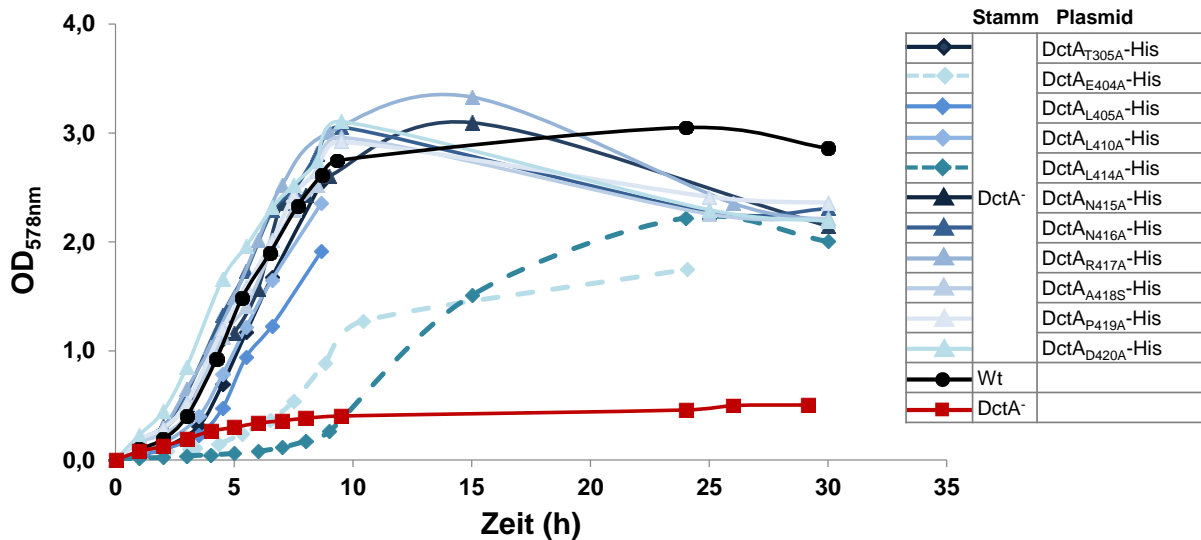


Abb. 55: Wachstumskomplementation von DctA-negativen Stämmen (DctA<sup>-</sup>, MDO800) durch Varianten des für die Überexpression und Reinigung erstellten Fusionsproteins DctA-His (pMW1194). Die Zucht erfolgte aerob in eM9 + 50 mM Fumarat. Als Positivkontrolle diente der Wildtypstamm MC4100. Die unkomplementierte Mutante MDO800 diente als Negativkontrolle. Die Plasmide wurden mit 50 µM L-Arabinose induziert. Folgende Varianten wurden getestet: T305A (pMW1503), E404A (pMW1484), L405A (pMW1485), L410A (pMW1477), L414A (pMW1271), N415A (pMW1272), N416A (pMW1273), R417A (pMW1274), A418S (pMW1275), P419A (pMW1276), D420A (pMW1277).

#### 4.8.7 Regulation von DctA- bzw. DcuB-negativen Stämmen durch plasmidkodiertes DctA

Zusätzlich zum Wachstum kann man die regulatorische Funktionsfähigkeit von DctA durch *dctA-lacZ*-Fusionen überprüfen (vgl. 4.2 Genexpression und Funktion von *dct*). Für die direkte Vergleichbarkeit mit *dcuB-lacZ* Messungen wurden die Expressionsmessungen (S. 68) immer mit Glycerin und Fumarat durchgeführt. Eine volle Induktion der *dctA*-Genexpression trat aber nur bei Verwendung von Fumarat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle auf. So wurde die Induktion im Wildtypstamm bei Zucht auf Fumarat als einzigem Substrat um den Faktor 58 gesteigert, bei zusätzlicher Anwesenheit von Glycerin nur um den Faktor 5,2 (Abb. 56). In einem DctA-negativen Stamm betrug der Induktionsfaktor durch Fumarat 3, bei zusätzlicher Anwesenheit von Glycerin sank er auf 1,4. Komplementation erfolgte durch ein auf dem pET28a-Vektor kloniertes *dctA*-Gen mit natürlicher Promotorregion. In

wildtypischer Form zeigte dieses Plasmid unter allen Wachstumsbedingungen (Glycerin, Fumarat, Glycerin + Fumarat) nur eine schwache *dctA-lacZ* Expression, also weder den regulatorischen Phänotyp des Wildtyps, noch den der chromosomal inaktivierten *dctA*-Mutante. Ebenso verhielten sich die Einzelmutanten N415A und N416A des wildtypischen Ausgangsplasmids. Die Mutante L414A hingegen wies eine im Vergleich zur wildtypischen Plasmidkomplementation gesteigerte Expression von *dctA-lacZ* nach Zucht mit Fumarat oder mit Fumarat plus Glycerin auf. Diese lag allerdings für Fumarat noch deutlich unter den Werten des chromosomalen Wildtyps und der DctA-negativen Mutante. Im Vergleich mit wildtypischem DctA-Plasmid und den beiden regulatorisch und in der Interaktion wildtypischen DctA-Varianten N415A und N416A, kann man im Fall von L414A aber von einem Defekt in der Regulation sprechen. Wildtypisches DctA komplementierte das Wachstum einer DctA-negativen Mutante vollständig und war somit funktional im Wachstum (Bauer, 2010).

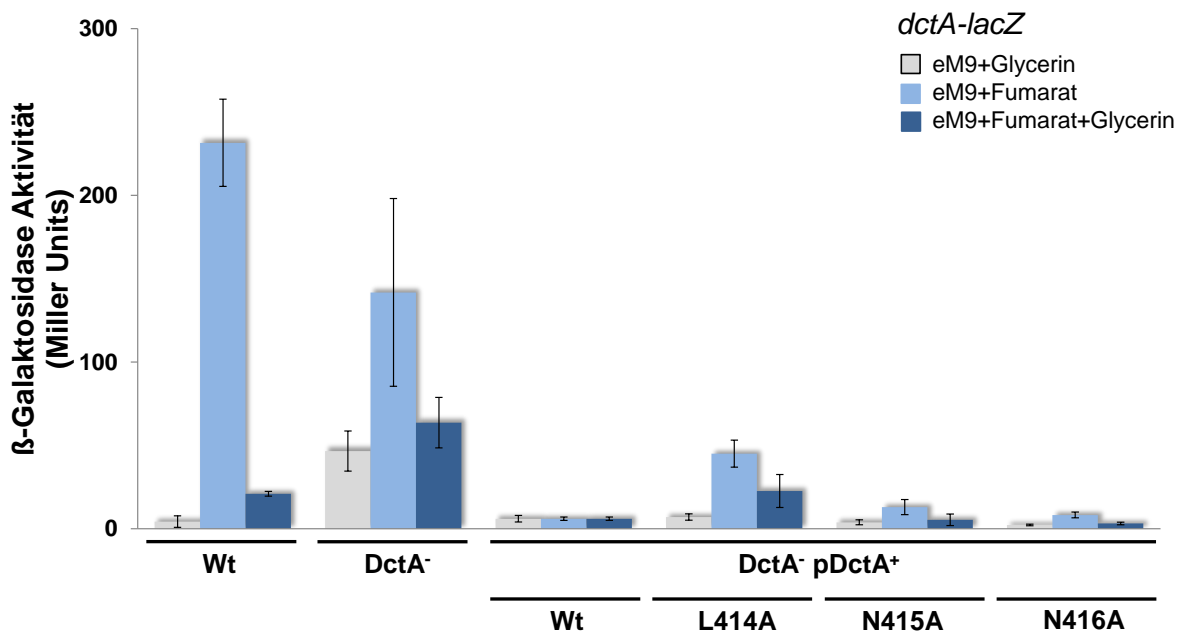


Abb. 56: Genexpression von *dctA-lacZ* in einem DctA-negativen Stamm und Komplementation durch plasmidkodierte DctA (pDctA<sup>+</sup>). Messung erfolgte nach aerober Zucht in eM9 mit Glycerin (grau), Fumarat (hellblau) oder Glycerin plus Fumarat (dunkelblau) mit dem Wildtyp (Wt, IMW385) und einer DctA-negativen Mutante (DctA<sup>-</sup>, IMW386). Komplementiert wurde durch plasmidkodierte wildtypisches DctA unter Kontrolle eines natürlichen Promotors (pDctA<sup>+</sup>, pMW457) und drei verschiedene Einzelmutanten (L414A, pMW1341; N415A, pMW1342; N416A, pMW1343).

Möglicherweise führte die Überexpression von DctA zu einer permanenten Bindung an DcuS und somit zur Repression der eigenen Expression. Um zu überprüfen, ob DctA unter anaeroben Bedingungen auch die regulatorische Funktion von DcuB übernehmen kann, wurden *dcuB-lacZ* Messungen in einem DcuB-negativen Stamm unter anaeroben Zuchtbedingungen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene DctA-Varianten künstlich durch ein induzierbares Plasmid exprimiert. Als Plasmide wurden die DctA-His-Plasmide, die bereits bei der Wachstumskomplementation einer DctA-negativen Mutante zum Einsatz kamen (vgl. Abb. 55), verwendet. Die Zucht erfolgte anaerob auf eM9 + Glycerin + DMSO, mit oder ohne Fumarat als zusätzlichen Elektronenakzeptor. In einem Wildtypstamm mit *dcuB-lacZ*-Fusion ließ sich die Expression von *dcuB-lacZ* durch Fumarat um den Faktor 14 steigern (Abb. 57). In der DcuB-negativen Mutante hingegen war die Expression schon ohne Fumarat sehr hoch und konnte nur leicht gesteigert werden. In einem durch wildtypisches DctA-His komplementierten DcuB-negativen Stamm betrug der Unterschied zwischen Kulturen mit und ohne Fumarat Faktor 3,5. Die DctA-Mutanten N415A und N416A verhielten sich sehr ähnlich. Die plasmidkodierte DctA<sub>L414A</sub>-His Mutante hingegen hatte mit Faktor 1,4 einen fast identischen Wert mit dem des unkomplementierten DcuB-negativen Stamms. Der absolute *dcuB-lacZ*-Wert des wildtypischen DctA-His, DctA<sub>N415A</sub>-His oder DctA<sub>N416A</sub>-His komplementierten Stamms war um 75 % geringer als derjenige der unkomplementierten DcuB-negativen Mutante. Der entsprechende Wert für die DctA<sub>L414A</sub>-His Variante war mit 44 % fast doppelt so hoch. Somit komplementierten alle DctA kodierenden Plasmide, bis auf DctA<sub>L414A</sub>-His, eine DcuB-Deletion zumindest teilweise. DctA konnte die regulatorische Funktion von DcuB unter anaeroben Bedingungen übernehmen.



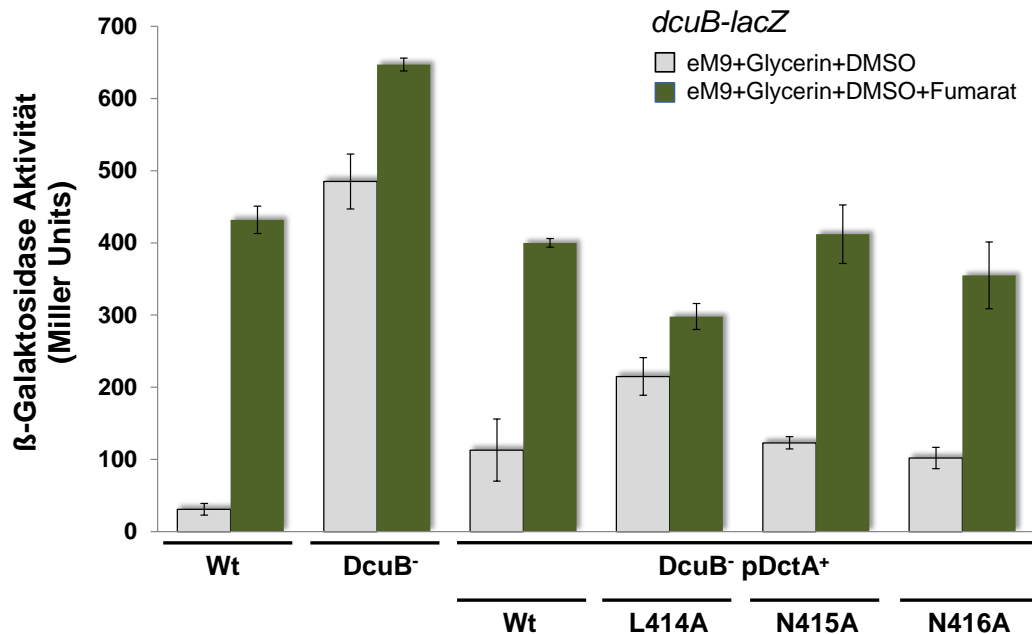


Abb. 57: **Genexpression von *dcuB-lacZ* in einem *DcuB*-negativen Stamm und Komplementation durch plasmidkodiertes *DctA* (*pDctA*<sup>+</sup>).** Messung erfolgte nach anaerober Zucht in eM9 mit Glycerin und DMSO mit (grün) oder ohne (grau) Fumarat in dem Wildtyp (Wt, IMW237) und einer *DcuB*-negativen Mutante (*DcuB*<sup>-</sup>, IMW503). Komplementiert wurde durch ein plasmidkodiertes induzierbares Wildtyp *DctA*-Plasmid (*pDctA*<sup>+</sup>, pMW1194) und drei verschiedenen Einzelmutanten (L414A, pMW1271; N415A, pMW1272; N416A, pMW1273). Die *DctA*-Expression wurde mit 50  $\mu$ M L-Arabinose induziert.

#### 4.9 BACTH: Interaktion von verkürztem *DctA* als *MalE*-Fusionsprotein mit *DctA* (Homodimerisierung)

Durch die Experimente zur *MalE-DctA*<sub>362-428</sub>-T18 Interaktion mit *DcuS* konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von *DctA* mit *DcuS* interagiert (vgl. S. 87). Das gleiche Prinzip wurde für die Messung der Interaktion von *MalE-DctA*<sub>362-428</sub>-T18 mit *DctA* angewendet.

Das N-terminal verkürzte *DctA*-Protein *DctA*<sub>362-428</sub>-T25 ohne *MalE*-Fusion zeigte im BACTH-Test keine Interaktion mit T18-*DctA* und *DctA*-T18 (Abb. 58). Ebenso wenig interagierten die T18-fusionierten Konstrukte *DctA*<sub>362-428</sub>-T18 und *MalE-DctA*<sub>362-428</sub>-T18 mit *DctA*-T25. Mit T25-*DctA* hingegen zeigten sie eine Interaktion, wobei das *MalE*-fusionierte Konstrukt die geringere Aktivität hatte, wahrscheinlich weil *MalE* nicht richtig exportiert worden war. Kombinationen mit *MalE-DctA*<sub>362-428</sub>-T25 als Wildtyp oder L414A Mutante wiesen eine größere Aktivität auf. Die Mutante L414A hatte gegenüber dem Wildtyp eine deutlich reduzierte Aktivität von 30 % (T18-*DctA*) und 60 % (*DctA*-T18).

Die MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T25 Expression war nicht stabil. So entstanden bei der Kombination mit Volllängen-DctA jeweils blaue und weiße Kolonien in einer Transformation (Abb. 58).

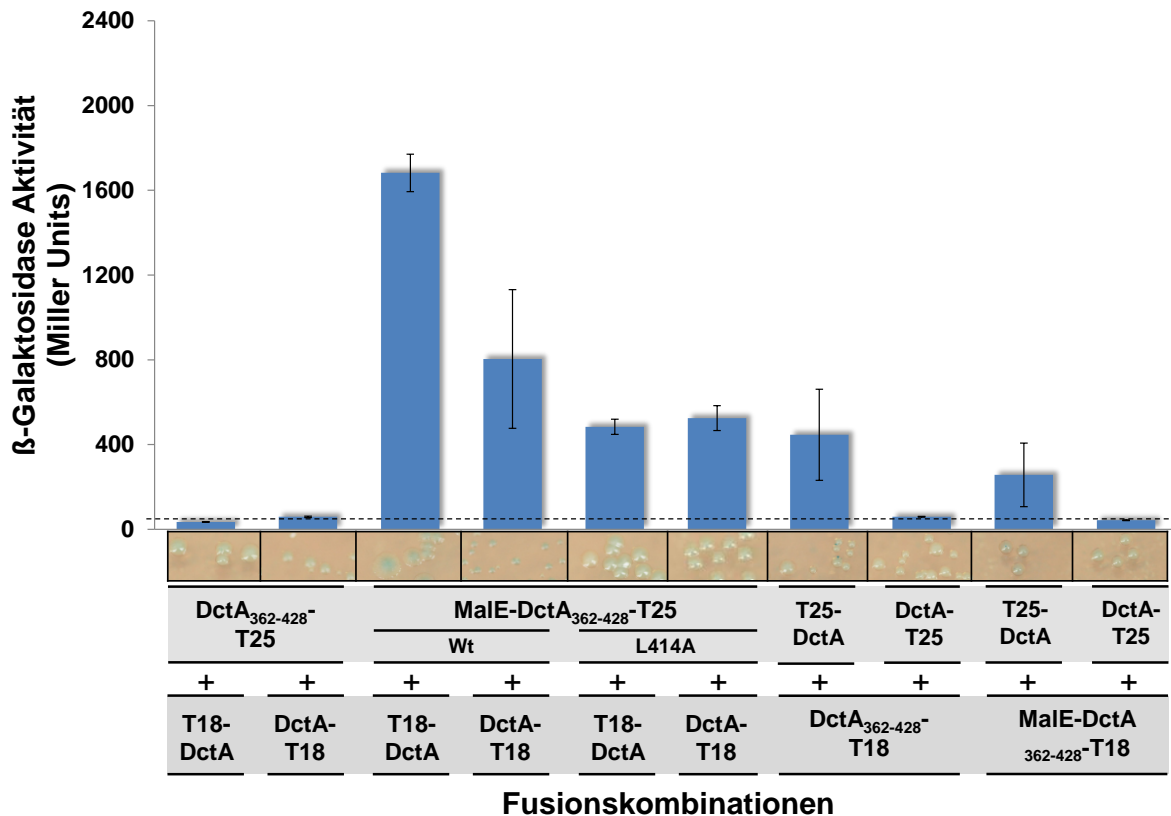


Abb. 58: **Interaktion von MalE-fusionierten oder unfusionierten DctA-Konstrukten mit DctA.** N-terminal verkürztes DctA-T25 ohne (DctA<sub>362-428</sub>-T25, pMW1641) oder mit N-terminaler MalE-Fusion (MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T25, pMW1647; MalE-DctA<sub>362-428</sub>-L414A-T25, pMW1649) wurde mit N- oder C-terminal fusioniertem DctA (T18-DctA, pMW917; DctA-T18, pMW918) kombiniert. In umgekehrter Kombination wurde N- oder C-terminal fusioniertes DctA (T25-DctA, pMW856; DctA-T25, pMW858) mit DctA<sub>362-428</sub>-T18 (pMW1643), DctA<sub>362-428</sub>-L414A-T18 (pMW1644) und MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T18 (pMW1648) transformiert. Zusätzlich ist die Färbung der Kolonien angegeben.

## 4.10 BACTH: Interaktion von DcuS mit DcuS (Homodimerisierung)

### 4.10.1 Interaktion von DcuS-Fusionsproteinen

Die Homooligomerisierung von DcuS konnte zuvor mit FRET (= Fluorescence resonance energy transfer) und Cross-Linking nachgewiesen werden (Scheu et al., 2010). Hier wurde erstmals die Interaktion verschiedener DcuS-Fusionsproteine durch Messungen im BACTH-System, ähnlich zu der Homomerisierung von DctA, nachgewiesen. Es wurden alle vier möglichen Kombinationen getestet (Abb. 59; DcuS-T25/T18-DcuS, T25-DcuS/DcuS-T18, T25-DcuS/T18-DcuS, DcuS-T25/DcuS-T18). In der qualitativen Bestimmung wiesen alle

Fusionskombinationen blaue Kolonien auf (positive Interaktion, Tab. 17), allerdings ließen sich im Fall von DcuS-T25 kombiniert mit DcuS-T18 keine quantitativ positiven Ergebnisse erzielen. Kolonien blieben für diese Kombination klein und das Wachstum war extrem eingeschränkt, was eine Messung erschwerte.

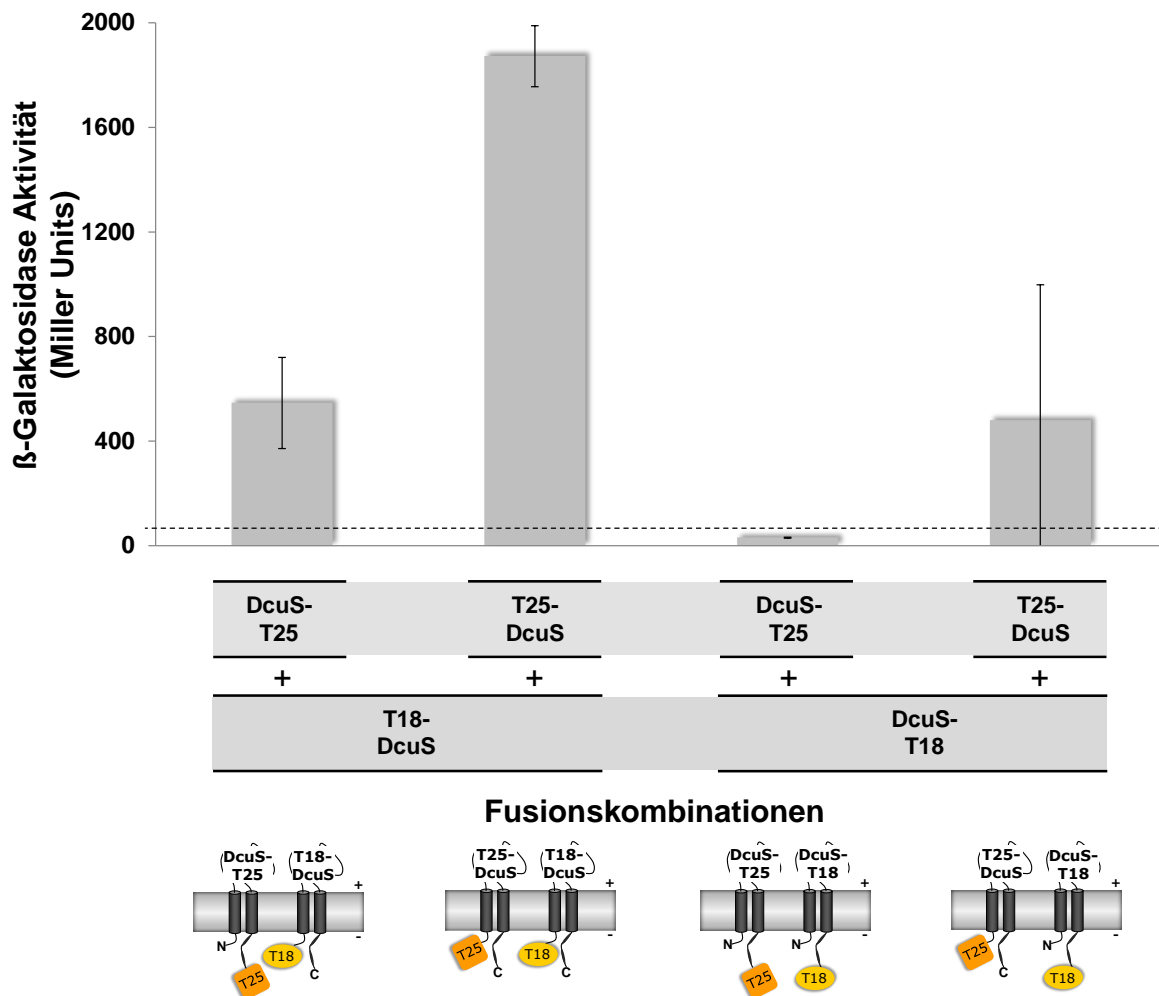


Abb. 59: **Interaktion von DcuS mit DcuS (Homodimerisierung) in verschiedenen Fusionskombinationen.** DcuS wurde jeweils an seinem N- oder C-Terminus mit einem T25 oder T18-Fragment fusioniert. Alle vier möglichen Kombinationen wurden danach in BTH101 auf ihre Interaktion gemessen. DcuS-Fusionen: DcuS-T25 (pMW919), T25-DcuS (pMW426), DcuS-T18 (pMW428), T18-DcuS (pMW429).

#### 4.10.2 Regulation eines DcuS-Deletionsstamms durch plasmidkodiertes DcuS

Mit Wachstumsexperimenten konnte keine Komplementation eines DcuS-negativen Stamms durch plasmidkodierte DcuS-Fusionsproteine des BACTH-Systems erreicht werden (Abb. A8). Eine regulatorische Komplementation und Messung durch *dcuB-lacZ* zeigten ebenfalls keine vollständige Komplementation (Abb. 60). Im Wildtyp wurde *dcuB-lacZ* durch Fumarat stark induziert. Diese Induktion fiel für DcuS-T25 und T25-DcuS komplementierte, chromosomal deletierte DcuS-Stämme deutlich schwächer aus. Im DcuS-T25 komplementierten Stamm war außerdem die *dcuB-lacZ* Aktivität ohne Fumarat im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 4,4 erhöht. Die Induktion durch Fumarat war um den Faktor 25,5 höher als in der DcuS-negativen Mutante, aber um den Faktor 2,7 niedriger als im Wildtyp.

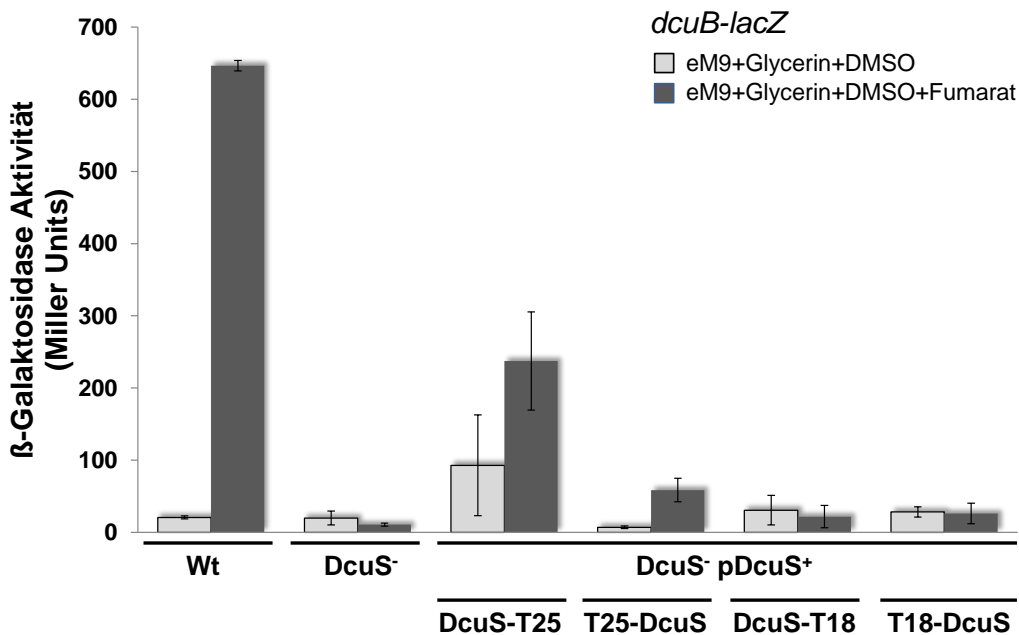


Abb. 60: **Genexpression von *dcuB* in einem DcuS-negativen Stamm und Komplementation durch plasmidkodiertes DcuS (pDcuS<sup>+</sup>)**. Messung erfolgte nach anaerober Zucht in eM9 mit Glycerin und DMSO mit (dunkelgrau) oder ohne (hellgrau) Fumarat im Wildtyp (Wt, IMW237) und einer DcuS-negativen Mutante (DcuS<sup>-</sup>, IMW260). Die Komplementation durch die DcuS-Fusionsplasmide DcuS-T25 (pMW919), T25-DcuS (pMW426), DcuS-T18 (pMW428), T18-DcuS (pMW429) erfolgte ohne zusätzliche Induktion oder mit 100  $\mu$ M IPTG.

Der T25-DcuS komplementierte Stamm hatte ohne Fumarat eine vergleichbare Aktivität wie der Wildtyp und der DcuS-negative Stamm. Mit Fumarat war diese im Vergleich zur Deletionsmutante um den Faktor 5,4 erhöht, im Vergleich zum Wildtyp aber um den Faktor 11 niedriger. Mit DcuS-T18 und T18-DcuS konnte keine Komplementation erreicht werden.

Beide Gene wurden aus den entsprechenden T25 Varianten umkloniert und sind somit identisch, abgesehen von der T18-Fusion und der höheren Kopienzahl des Vektors. Wildtypisches DcuS mit His-Tag unter Kontrolle eines künstlich induzierbaren Promotors (pMW151) zeigte in vergleichbaren Experimenten (Scheu, 2005) ebenfalls keine vollständige Wiederherstellung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Diese lag für wildtypisches DcuS bei ungefähr 200 Miller Units. Auch mit einem Expressionsplasmid für wildtypisches DcuS ohne His-Tag unter Kontrolle des wildtypischen Promotors (pMW181) wurden Werte von ungefähr 200 Miller Units erreicht. Wahrscheinlich beeinträchtigte die Überexpression von DcuS die Komplementation nachteilig. Das würde auch erklären, warum Plasmide mit niedrigerer Kopienzahl (T25) besser komplementierten als die mit höherer Kopienzahl (T18).

#### 4.11 BACTH: Interaktion und Kontrollen verschiedener Proteine

Das Hauptaugenmerk der Arbeit lag in Messungen der DctA/DctA-, DctA/DcuS- und DcuB/DcuS-Interaktion. Es wurden jedoch auch noch andere Interaktionen gemessen. Alle wildtypischen Vollängenproteine, die für Messungen verwendet wurden, sind in Tab. 17 qualitativ (Blaufärbung als Maß der Interaktion) und in Tab. A1 quantitativ dargestellt (Aktivität in Miller Units). Als Kontrolle für alle Proteininteraktionen dienten N-terminale T25- oder T18-Fusionen mit einem Leucin Zipper (T25-Zip, T18-Zip). Diese liegen cytosolisch vor und bilden ein starkes Homodimer (Karimova et al., 2005; 1254 Miller Units). Als Negativkontrolle wurden T25-Zip und T18-Zip mit einem der membranintegrierten oder cytosolischen Vollängenkonstrukte, die untersucht worden waren, kombiniert. Es zeigte sich keine Blaufärbung und immer eine Aktivität von weniger als 55 Miller Units. Die Hintergrundaktivität für unspezifische Reaktionen wurde somit auf 55 Miller Units festgelegt. DcuS (Sensor für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate), Tsr (Chemotaxis Sensor für Serin) und DctA (C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transport) wurden auf Homodimerisierung untersucht und bildeten eindeutig mindestens Homodimere aus. Der Antwortregulator des DcuSR Zweikomponentensystems DcuR wies als N-terminale T25-Fusion eine sehr spezifische Interaktion mit dem entsprechenden Sensor DcuS auf. DcuS interagierte, außer mit den schon ausführlich besprochenen Proteinen DctA, DcuB, DcuS und seinem Antwortregulator DcuR, noch mit CitA und Tsr. Die Interaktion von DcuS beschränkte sich dabei auf den strukturverwandten Sensor CitA (Citraterkennung) des CitAB Zweikomponentensystems. Der Antwortregulator CitB interagiert nicht mit DcuS, sondern ausschließlich mit dem Sensorprotein CitA. Somit wurde der durch bioinformatische Analysen (Procaccini et al., 2011) vorhergesagte Cross-

Talk zwischen DcuS und CitB widerlegt. DcuS bildete allerdings Heterodimere mit CitA in BACTH- (Tab. 17, Tab. A1) und FRET-Messungen (Scheu et al., 2012). Dieser Cross-Talk zwischen DcuS und CitA führte jedoch nicht zu einer Cross-Regulation; die Genexpression der Zielgene wurde also nicht durch den Cross-Talk modifiziert. Eine Interaktion von DcuS mit Tsr war in allen Kombinationen zu beobachten (Tab. 17). Tsr interagiert ebenfalls, wenn auch schwächer, mit CitA, DcuB-SW und DctA. Möglicherweise spielen DcuS, DctA, CitA und DcuB eine noch nicht charakterisierte Rolle in der Chemotaxis von *E. coli*. Das DcuB-Sandwich-Konstrukt DcuB-SW zeigte Interaktion mit DctA und DctA interagiert mit CitA. Diese Interaktionen sind nicht physiologisch, da DcuB und CitA nur eine anaerobe und DctA nur eine aerobe Expression zeigen. DcuB-SW interagiert ebenfalls mit CitA (Tab. 17), modifizierte die Expression der Zielgene von CitA jedoch nicht (Scheu et al., 2012).

Tab. 17: **Qualitative Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinpaaren.** Von den untersuchten Proteinpaaren enthält jeweils eines ein an den N- oder C-Terminus fusioniertes T25-Fragment und das andere ein T18-Fragment. Eine blaue Färbung der Kolonien zeigt eine Protein-Protein-Interaktion an; bleiben die Kolonien weiß, so ist keine Interaktion vorhanden. Fusionsproteine: DcuS-T25 (pMW919), T25-DcuS (pMW426), DcuS-T18 (pMW428), T18-DcuS (pMW429), DctA-T25 (pMW858), T25-DctA (pMW856), DctA-T18 (pMW918), T18-DctA (pMW917), Tsr-T25 (pMW1443), T25-Tsr (pMW1444), Tsr-T18 (pMW1446), T18-Tsr (pMW1445), T25-DcuR (pMW427), CitB-T25 (pMW1358), DcuB-SW (pMW1028), CitA-T18 (pMW1026), T18-CitA (pMW1025), T25-Zip, T18-Zip.

	DcuS-T18	T18-DcuS	DctA-T18	T18-DctA	Tsr-T18	T18-Tsr	CitA-T18	T18-CitA	T18-Zip
DcuS-T25									
T25-DcuS									
DctA-T25									
T25-DctA									
Tsr-T25									
T25-Tsr									
T25-DcuR									
CitB-T25									
DcuB-SW									
T25-Zip									

## 4.12 Überproduktion, *in vivo* Cross-Linking und Lokalisation von DctA

Die Überproduktion von DctA aus verschiedenen Plasmiden wurde unter variierenden Expressionsbedingungen bestimmt. Hierbei wurden die Induktionsstärke und Induktionsdauer sowie die Art der Plasmide und der Nachweis durch Antikörper gegen verschiedene an DctA fusionierte Protein-Tags (His-Tag, Strep-Tag) ausprobiert. Mit Hilfe der optimierten Expressionsbedingungen wurde dann ein *in vivo* Cross-Linking von DctA mit DctA, DcuS, DcuR und Tsr durchgeführt. Außerdem wurde die Membranintegration der DctA-Varianten L414A, N415A und DctA1-28-PhoA mittels Saccharosegradientenultrazentrifugation überprüft. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sollte ebenfalls die Membranintegration sowie zusätzlich die Lokalisation von L414A, N415A und N416A nachgewiesen werden.

### 4.12.1 Überproduktion und Nachweis von DctA

Membranproteine sind deutlich schlechter zu exprimieren als lösliche Proteine. Die Expression wird im Allgemeinen mit steigender Anzahl der Transmembranhelices schwieriger (Dobrovetsky et al., 2004). DctA besitzt mit acht Transmembranhelices vier weniger als DcuB, das kaum überproduzierbar ist, und sechs Transmembranhelices mehr als das relativ leicht zu exprimierende DcuS. Da also eine relativ niedrige Expressionsstärke erwartet wurde, erfolgte der Nachweis für DctA nach Auftrennung auf einem SDS-Gel und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran durch Antikörper. Um die Expression von DctA zu optimieren, wurden DctA-Plasmide in die Vektoren pASK-IBA3<sup>+</sup>, pET28a, pBAD18K\* und pBAD30 kloniert. pET28a ist ein konstitutiv durch IPTG induzierbares Plasmid hoher Kopienzahl und mit Option für ein N- und C-terminales His-Tag. pASK-IBA3<sup>+</sup> ist ein konstitutiv durch Anhydrotetracyclin induzierbares Plasmid mit Option für ein C-terminales Strep-Tag. Die beiden Vektoren pBAD18K\* (mittlere Kopienzahl) und pBAD30 (niedrige Kopienzahl) wurden für die Expression von Membranproteinen erstellt (Guzman et al., 1995) und besitzen eine über Induktion mit L-Arabinose regulierbare Expressionsstärke. Aufgrund der schwierigen Expression wurde für DctA ein Antikörper gegen das synthetische Oligopeptid DctA<sub>265-280</sub> GTSSSESALPRMLDK produziert. Dieser Antikörper erwies sich aber in verschiedenen Versuchen als unspezifisch (Abb. A9, Abb. A10). Der Nachweis mit C-terminalem Strep-Tag (pASK-IBA3<sup>+</sup>-Derivate) erwies sich als wesentlich weniger sensitiv im Vergleich zu dem mit His-Tag (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde die Expression von DctA mit N- und C-terminalem His-Tag aus pET28a (pMW505), pBAD18K\* (pMW1194) und pBAD30 (pMW1195) miteinander verglichen. Die Induktion mit 67 µM, 670 µM, 13 mM



oder ohne L-Arabinose wurde bei einer  $OD_{578nm} = 0,5-0,7$  gestartet und nach einer, drei oder fünf Stunden gestoppt.

Abb. 61 und Abb. 62 (A) zeigen jeweils den Nachweis von DctA über einen anti-His-Antikörper durch die insensitivere Chlornaphthol Färbung, während (B) den sensitiveren Nachweis mit Chemilumineszenz führt. Wie zu erkennen ist, trat ohne Induktion bei Nachweis mit einem anti-His Antikörper keine Bande auf (Abb. 61 und Abb. 62, Spuren 10). Bei allen DctA-His exprimierenden Plasmiden hingegen trat eine Bande bei ungefähr 37 kDa auf. Die erwartete molekulare Masse von DctA mit His-Tag betrug aber 50,13 kDa. Viele Membranproteine und auch DctA laufen auf einem SDS-Gel jedoch tiefer als ihr eigentliches Molekulargewicht. In anderen Versuchen lief DctA ohne Tag bei 34 kDa (Geertsma et al., 2008). Die Bande bei 37 kDa repräsentiert also monomeres DctA. Die stärkste Expression wurde in den pBAD-Vektoren nach drei Stunden und in pET28a nach 5 Stunden erreicht. Bei einer Induktion von mehr als 3 Stunden nahm die Expression durch die pBAD-Vektoren wieder ab (Abb. 61 und Abb. 62).

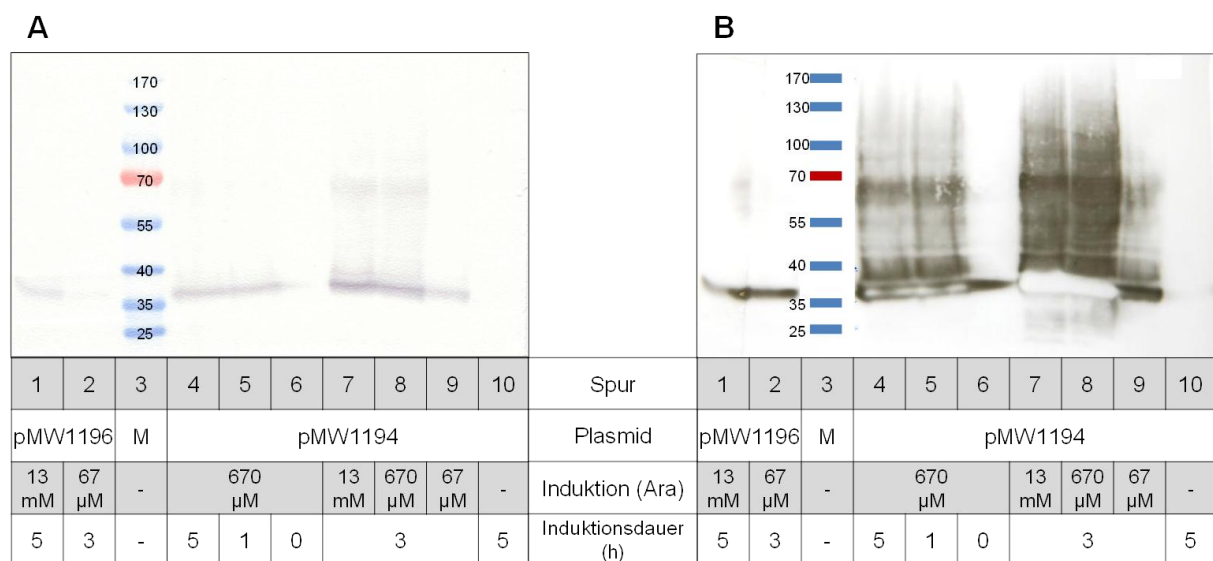


Abb. 61: **Nachweis der Synthese von plasmidkodiertem DctA-His mit Immunoblotting.** (A) Antikörpernachweis mit Chlornaphthol. (B) Antikörperfärbung mit Chemilumineszenz. Es wurden folgende Proteine exprimiert: Die cysteinlose DctA-Variante DctA<sub>C<sub>3</sub>S</sub>-His aus pBAD18K\* (pMW1196) und Wildtyp DctA-His aus pBAD18K\* (pMW1194). Es wurden pro Spur 100 μg Gesamtprotein aufgetragen. M = Marker SM0671, Ara = L-Arabinose.

Die Expressionsstärke war in den pBAD-Vektoren bei 670 μM (Abb. 61, Abb. 62, Spur 8) L-Arabinose am stärksten und konnte nicht weiter durch die Zugabe von mehr L-Arabinose gesteigert werden. Die Wachstumsrate fiel hingegen mit steigender L-Arabinose

Konzentration (Daten nicht gezeigt). Die Stärke der Expression war in pBAD18K\* (pMW1194) am größten, gefolgt von pBAD30 (pMW1195) und pET28a (pMW505). Eine Variante von DctA, bei der alle vier Cysteine gegen Serin ausgetauscht wurden (DctA<sub>C<sub>→</sub>S</sub>-His, pMW1196, Abb. 61 Spuren 1 + 2), zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine wesentlich schwächere Expression. Die optimale Expressionsbedingung für die Überproduktion von DctA war somit: DctA-His aus pBAD18K\* (pMW1194) im Stamm C43 bei 30°C gezüchtet und mit 670 µM L-Arabinose für 3 Stunden induziert.

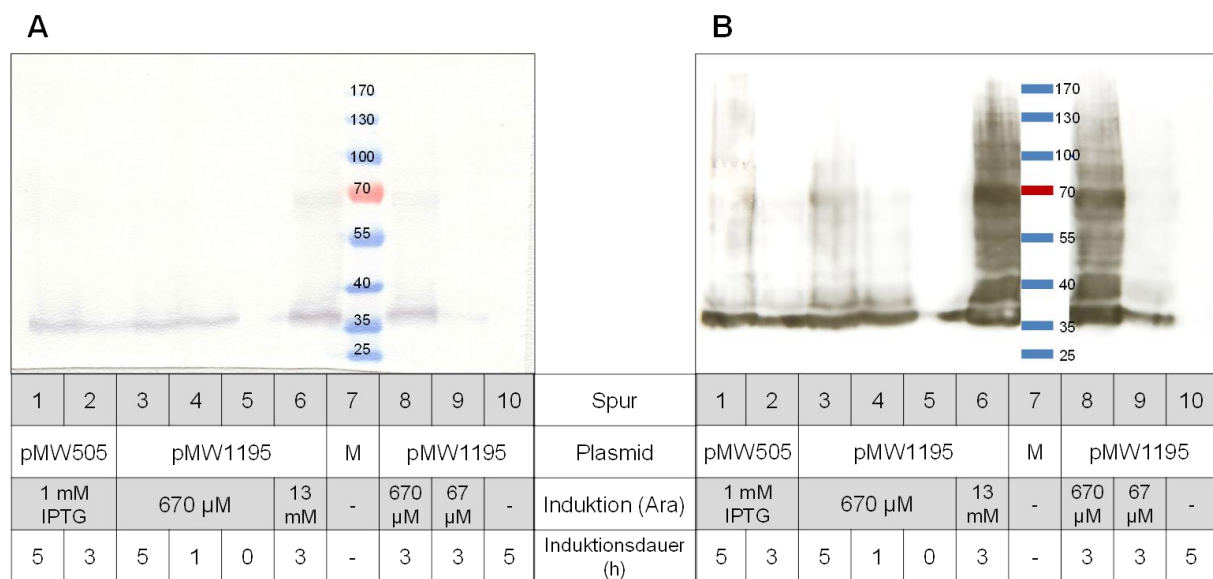


Abb. 62: **Nachweis der Synthese von plasmidkodiertem DctA-His mit Immunoblotting.** (A) Antikörpernachweis mit Chlornaphtol. (B) Antikörperfärbung mit Chemilumineszenz. Es wurden folgende Proteine exprimiert: DctA-His aus pET28a (pMW505), DctA-His aus pBAD30 (pMW1195). Es wurden pro Spur 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. M = Marker SM0671, Ara = L-Arabinose, IPTG = Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid.

Die Funktionalität der verwendeten Expressionsplasmide mit His-Tag und Strep-Tag wurde in Wachstumsversuchen nachgewiesen. Selbst ohne Induktion der Plasmide konnte die chromosomale Deletion von *dctA* komplementiert werden. DctA-Strep wuchs etwas besser als DctA mit N- und C-terminalem His-Tag (pMW505). Am schlechtesten wuchs DctA<sub>C<sub>→</sub>S</sub>-His, jedoch wuchs sie immer noch wesentlich besser als der unkomplementierte DctA-negative Stamm MDO800.

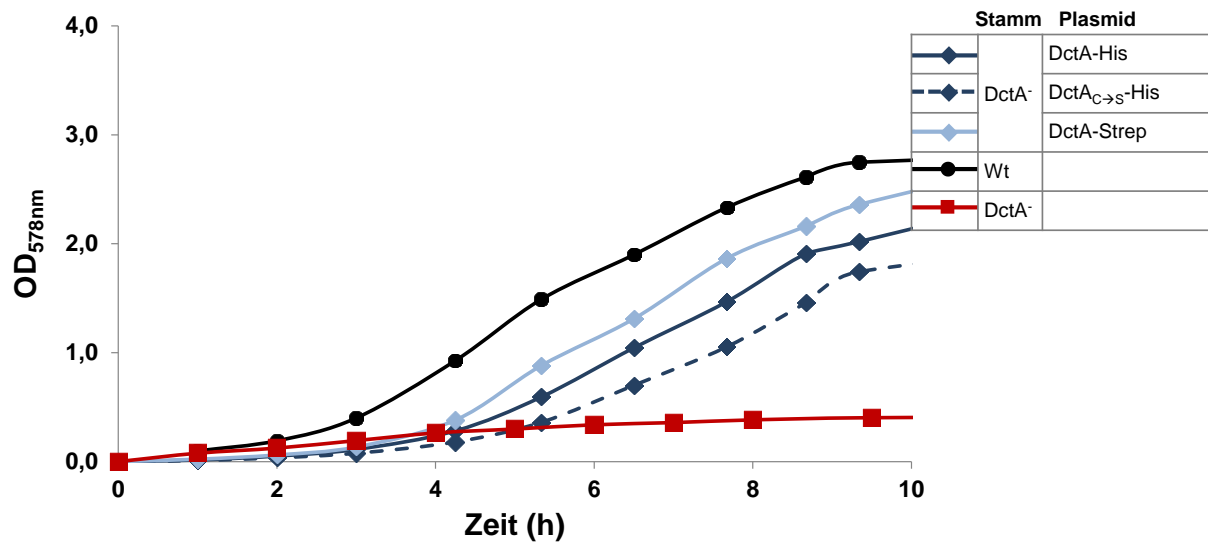


Abb. 63: Wachstumskomplementation eines DctA-negativen Stamms (DctA<sup>-</sup>, MDO800) durch für die DctA Überexpression und Reinigung erstellte Fusionsproteine. Es wurden DctA mit N- und C-terminalem His-Tag im Wildtyp (DctA-His, pMW505) und mit Substitution aller Cysteinreste durch Serin (DctA<sub>C→S</sub>-His, pMW1024) komplementiert. Des Weiteren wurde DctA mit C-terminalem Strep-Tag (DctA-Strep, pMW1104) zur Komplementation verwendet. Die Zucht erfolgte aerob in eM9 + 50 mM Fumarat. Als Positivkontrolle diente der Wildtypstamm AN387. Die unkomplementierte Mutante MDO800 diente als Negativkontrolle. Es erfolgte keine Induktion der Plasmide.

#### 4.12.2 Protein-Protein-Interaktionen: *In vivo* Cross-Linking von DctA durch DSS

DSS (Disuccinimidyl Suberat) ist ein membrangängiger, nicht spaltbarer, homobifunktionaler Cross-Linker mit einer Länge von 11,4 Å. Es besitzt N-Hydroxysuccinimid Ester, die mit primären Aminen wie Lysin eine stabile Amidbindung eingehen. Nach der *in vivo* Cross-Linking Reaktion eines DctA überproduzierenden Stamms mit DSS in verschiedenen Konzentrationen, wurde das Gesamtprotein durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und durch Antikörper nachgewiesen. Wie zuvor bestimmt, läuft monomeres DctA in einem SDS-Gel bei ca. 37 kDa. Ohne Zugabe des Cross-Linkers war nach maximaler Expression von DctA-His und der Variante DctA<sub>L414A</sub>-His nur die für DctA typische Bande bei 37 kDa zu erkennen (Abb. 64, Spuren 1 und 5). Schon bei einer Zugabe von 60 µM DSS tauchte eine zweite Bande bei ungefähr 90 kDa auf. Diese Bande könnte ein DctA Dimer oder Trimer sein. Das Molekulargewicht passt weder genau zu der Dimer- noch zu einer Trimerform. Da alle bisher charakterisierten Mitglieder der DAACS-Familie jedoch Trimere bilden, ist anzunehmen, dass diese Bande ebenfalls ein DctA Trimer repräsentierte.

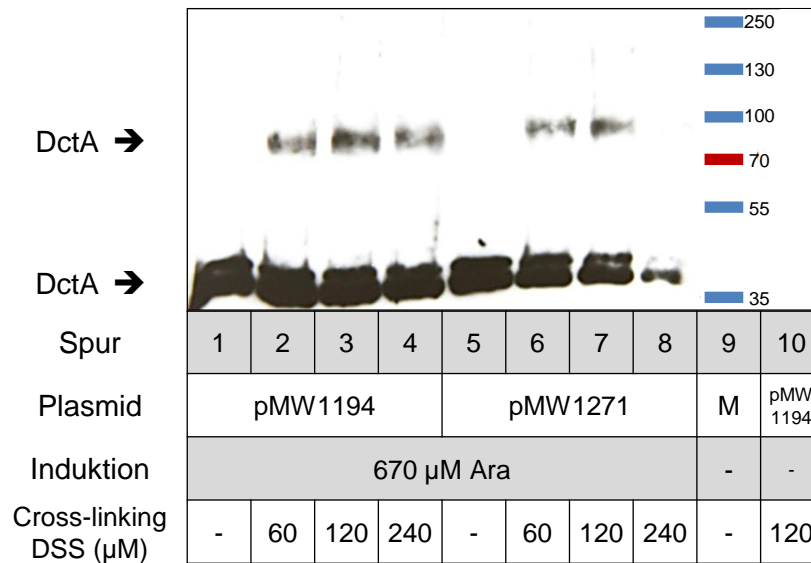


Abb. 64: *In vivo* Cross-Linking von DctA-His (pMW1194) und DctA<sub>L414A</sub>-His (pMW1271) mit DSS. Die Bakterien wurden drei Stunden mit 670  $\mu$ M L-Arabinose (Ara) induziert und dann mit DSS inkubiert. 10  $\mu$ g Gesamtprotein wurden pro Bahn aufgetragen. DctA wurde mit anti-His Antikörpern und Chemilumineszenz nachgewiesen. M = Marker SM1811, Ara = L-Arabinose, DSS = Disuccinimidyl Suberat.

Bei sehr hohen DSS-Konzentrationen nahm die untere Bande ab und es bildeten sich hochmolekulare Aggregate. Im Unterschied zu den Messungen im BACTH-System zeigte DctA<sub>L414A</sub>-His eine deutliche Oligomerisierung. Es kam jedoch, wie bei den BACTH kodierenden DctA<sub>L414A</sub>-Varianten, auch mit DctA<sub>L414A</sub>-His zu einem Wachstumsverlust (vgl. Abb. 55). Vermutlich ist die erhöhte Expression von DctA<sub>L414A</sub>-His im Vergleich zu DctA<sub>L414A</sub>-T25 zusammen mit der kovalenten Verknüpfung von DSS der Grund für die auftretende Interaktion. Auf jeden Fall ist die Bildung eines Oligomers nach Zugabe von Cross-Linker ein deutlicher Hinweis auf einen korrekten Einbau von DctA<sub>L414A</sub>-T25 in die Membran. Ebenso wie die DctA-Oligomerisierung wurde auch die Interaktion von DctA mit DcuS durch Cross-Linking untersucht (Abb. 65). DctA-His wurde wieder als Wildtyp oder L414A-Variante aus pBAD18K\* exprimiert und zusätzlich wurde T18-DcuS durch Zugabe von 500  $\mu$ M IPTG co-exprimiert. Bei 37 kDa war die monomere DctA-Bande zu erkennen, wenn kein Cross-Linker hinzugegeben wurde. Mit zunehmenden Cross-Linker Konzentrationen verringerte sich diese Bande, bis hin zum Verschwinden bei 480  $\mu$ M DSS.

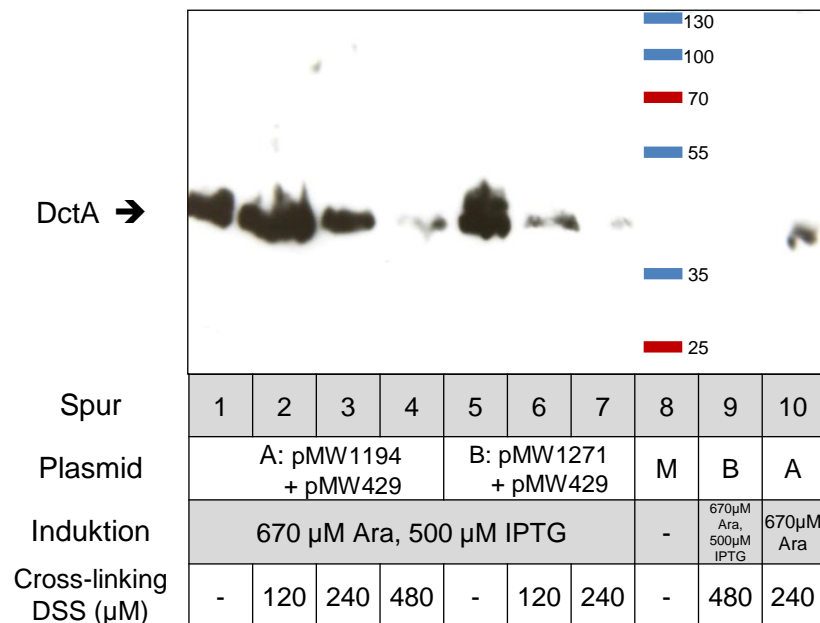


Abb. 65: *In vivo* Cross-Linking von DctA-His (pMW1194) und DctA<sub>L414A</sub>-His (pMW1271) mit DSS nach Co-Expression mit T18-DcuS (pMW429). Die Bakterien wurden drei Stunden mit 670  $\mu$ M L-Arabinose (Ara) und 500  $\mu$ M IPTG induziert und dann mit DSS inkubiert. 10  $\mu$ g Gesamtprotein wurden pro Bahn aufgetragen. DctA wurde mit anti-His Antikörpern und Chemilumineszenz nachgewiesen. M = Marker SM1811, Ara = L-Arabinose, DSS = Disuccinimidyl Suberat.

Es tauchte im Gegensatz zu einer reinen Expression von DctA-His bei einer Co-Expression mit T18-DcuS keine zweite Bande bei 90 kDa auf. Da DcuS als Dimer oder Tetramer vorliegt, beträgt die molekulare Masse von T18-DcuS als Dimer  $\sim$  160 kDa und die des Tetramers  $\sim$  320 kDa. Bei einer DctA-Interaktion mit DcuS im jeweils oligomeren Zustand, wie es die BACTH Experimente nahelegen, und einer minimalen Stöchiometrie von 1:1 ergibt sich somit eine molekulare Masse des Komplexes von mehr als 250 kDa. Diese sind nicht mehr auf dem Gel zu sehen, da die Auftrennung nicht gut genug ist. Das Verschwinden der zweiten DctA-Bande, zusammen mit dem Schwächerwerden der ersten Bande bei 37 kDa, spricht somit für eine DctA-His und DctA<sub>L414A</sub>-His Interaktion mit DcuS. Um weitere Kontrollen vorzunehmen, wurde DctA-His mit T18-DcuR und T18-Tsr co-exprimiert. Zusätzlich zu der monomeren DctA-His Bande bei 37 kDa war nach Zugabe von 120 oder 240  $\mu$ M DSS wieder eine oligomere Bande von 90 kDa zu erkennen. Diese verschwand bei 480  $\mu$ M DSS als Cross-Linker wieder. DctA-His interagiert also weder mit T18-DcuR noch mit T18-Tsr. Bei T18-DcuR wurde keine Interaktion erwartet, aber T18-Tsr zeigte in BACTH-Messungen Interaktion mit T25-DctA. Die Vermutung legt nahe, dass diese Interaktion sekundär zum Beispiel durch DcuS vermittelt werden könnte.

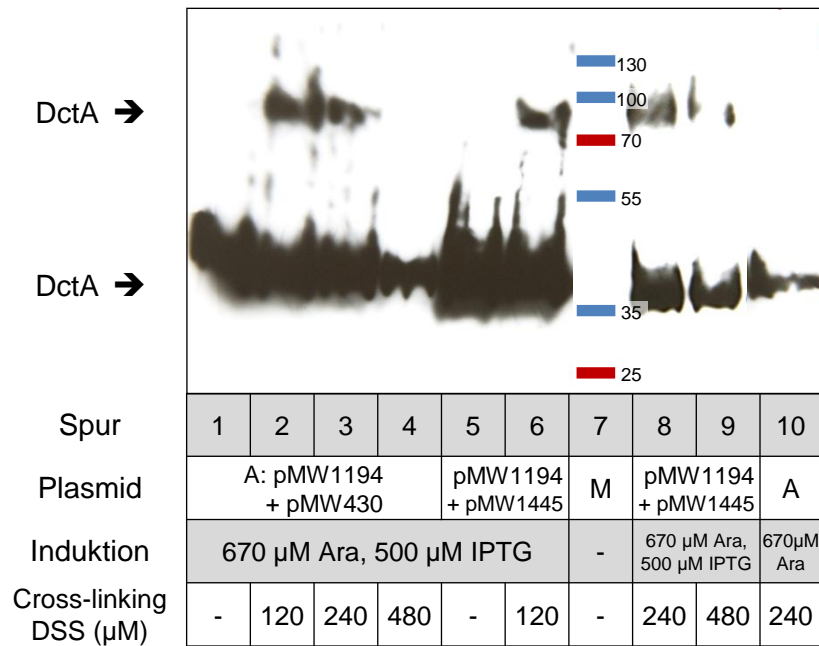


Abb. 66: *In vivo* Cross-Linking von DctA-His (pMW1194) mit DSS nach Co-Expression mit T18-DcuR (pMW431) oder T18-Tsr (pMW1445). Die Bakterien wurden drei Stunden mit 670 μM L-Arabinose (Ara) und 500 μM IPTG induziert und dann mit DSS inkubiert. 10 μg Gesamtprotein wurden pro Bahn aufgetragen. DctA wurde mit anti-His Antikörpern und Chemilumineszenz nachgewiesen. M = Marker SM1811, Ara = L-Arabinose, DSS = Disuccinimidyl Suberat.

#### 4.12.3 Nachweis der Membranintegration von DctA durch Saccharosegradientenultrazentrifugation

Schon die Mutation einzelner Aminosäuren kann erhebliche strukturelle Auswirkungen auf die Faltung und die Membranintegration von Membranproteinen haben. Wenn die Funktion einer Einzelmutante nicht mehr gegeben ist, wenn z. B. bei DctA<sub>L414A</sub> eine Beeinträchtigung der Interaktion und des Wachstums vorliegt, muss deshalb eine fehlende Expression oder eine fehlende Membranintegration als Ursache in Betracht gezogen werden. Mit Hilfe der Saccharosegradientenultrazentrifugation kann das Gesamtprotein in membranintegrale Proteine und Aggregate oder Proteine in der löslichen Fraktion über einen ansteigenden Saccharosegehalt von 0-45 % getrennt werden. Nicht mehr funktional eingebaute Proteine aggregieren (Abb. 67, Fraktion 1) oder befinden sich in der löslichen Proteinfraction (Abb. 67, Fraktion 4-7), wohingegen membranintegrales Protein in den Fraktionen 2 und 3 zu finden ist. Anschließend können die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und durch Antikörper nachgewiesen werden.

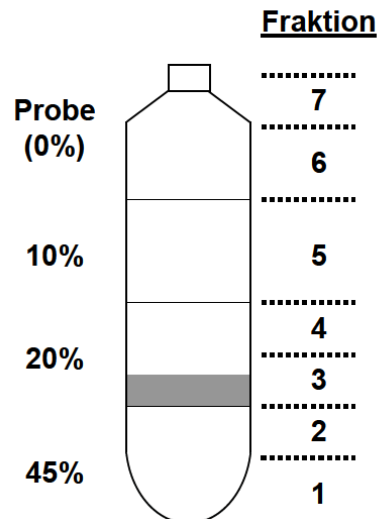


Abb. 67: **Saccharosedichtegradientenultrazentrifugation zur Fraktionierung von löslichen Proteinen und Membranproteinen.** Das Zellhomogenat wird über einen stufenweisen Saccharosegradienten (0-45 %) aufgetragen und durch Ultrazentrifugation in Aggregate, Membranfraktion und lösliches Protein aufgetrennt (Abb. übernommen aus Müller, 2007).

Mit der Saccharosedichtegradientenultrazentrifugation sollte der Einbau der in Wachstum und Interaktion nicht mehr funktionalen DctA-Variante L414A überprüft werden (Abb. 69). Als Kontrolle dienten wildtypisches DctA (Abb. 68) und die sich wildtypisch verhaltende Variante N415A (Abb. 70).

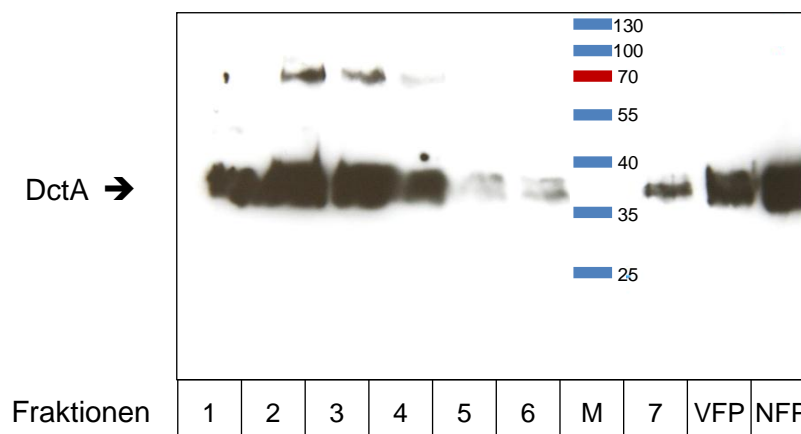


Abb. 68: **Fraktionierung des Zellhomogenats von DctA-His (pMW1194) exprimierenden Zellen (MC4100) nach Saccharosedichtegradientenultrazentrifugation.** Zucht und Nachweis erfolgten wie in Material und Methode beschrieben. 1-7 = Fraktionen 1-7, M = Marker, VFP = unaufgeschlossene Zellen, NFP = Zellhomogenat.

Bei DctA aus *E. coli* erhält man bei Überexpression unabhängig von der Expressionsstärke einen konstanten Anteil an Aggregaten (Geertsma et al., 2008). Die Expression erfolgte deshalb, wie zuvor für die Überexpression beschrieben, unter maximal induzierenden Bedingungen. Die durch die Saccharosedichtgradientenultrazentrifugation aus Gesamtprotein erhaltenen Fraktionen wurden jeweils in einer Spur, entsprechend dem Schema aus Abb. 67, aufgetragen.

Als Kontrollen wurden unaufgeschlossenes Zellhomogenat (VFP) und nicht durch Ultrazentrifugation getrenntes Gesamtprotein (NFP) aufgetragen. Wildtypisches DctA-His zeigte die größte Menge an DctA in den Fraktionen 2 und 3, gefolgt von den Fraktionen 1 und 4 (Abb. 68). Die Fraktionen 5, 6 und 7 enthielten kaum DctA. Wildtypisches DctA lag also hauptsächlich in der Membranfraktion vor, aggregierte jedoch wie zu erwarten auch teilweise. Die Funktionalität eines Großteils an DctA war jedoch gegeben, was auch die Wachstumsversuche belegten (Abb. 55). Für die beiden Varianten L414A (Abb. 69) und N415A (Abb. 70) verhielt es sich sehr ähnlich. Der Großteil von DctA befand sich in beiden Fällen in den Fraktionen 2 und 3, gefolgt von den Fraktionen 1 und 4. Die beiden Varianten DctA<sub>L414A</sub>-His und DctA<sub>N415A</sub>-His wurden somit in mit dem Wildtyp vergleichbaren Mengen DctA-His in die Membran eingebaut.

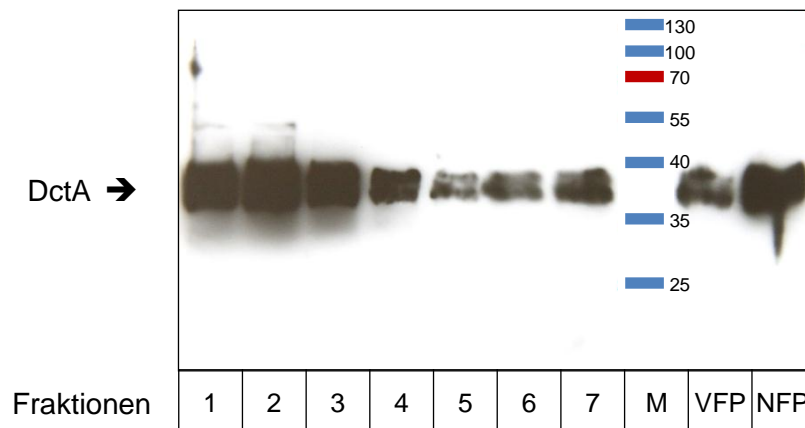


Abb. 69: **Fraktionierung des Zellhomogenats von DctA<sub>L414A</sub>-His (pMW1271) exprimierenden Zellen (MC4100) nach Saccharosedichtgradientenultrazentrifugation.** Zucht und Nachweis erfolgten wie in Material und Methode beschrieben. 1-7 = Fraktionen 1-7, M = Marker, VFP = unaufgeschlossene Zellen, NFP = Zellhomogenat.



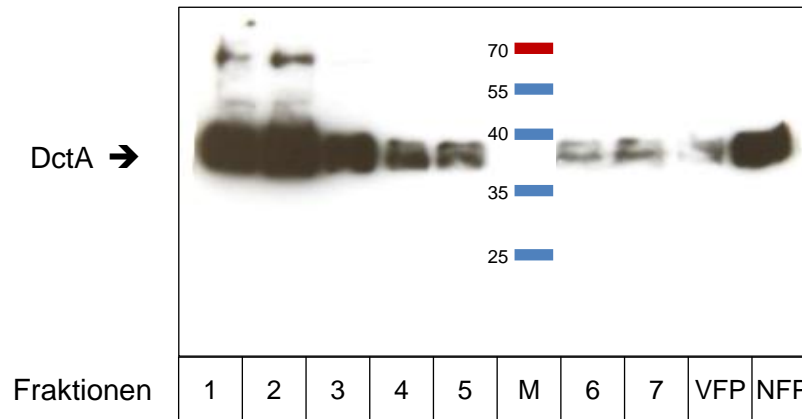


Abb. 70: **Fraktionierung des Zellhomogenats von DctA<sub>N415A</sub>-His (pMW1272) exprimierenden Zellen (MC4100) nach Saccharosedichtgradientenultrazentrifugation.** Zucht und Nachweis erfolgten wie in Material und Methode beschrieben. 1-7 = Fraktionen 1-7, M = Marker, VFP = unaufgeschlossene Zellen, NFP = Zellhomogenat.

Die Topologiebestimmung von DctA erfolgte durch sequentiell verkürzte LacZ- und PhoA-Fusionen. Die regelmäßig alternierenden PhoA- und LacZ-Werte sprachen für eine Membranintegration mit periplasmatischer bzw. cytoplasmatischer Lokalisation der C-Termini. Das am weitesten verkürzte Konstrukt, bestehend aus den Aminosäuren 1-28 von DctA und einer PhoA-Fusion (DctA<sub>1-28</sub>-PhoA), wurde auf seine Membranintegration überprüft. Die Vorgehensweise entsprach dem der Zucht für die Topologiebestimmung, kombiniert mit dem Nachweis der Membranintegration von DctA<sub>L414A</sub>-His. Als Antikörper wurde anti-PhoA statt anti-His verwendet.

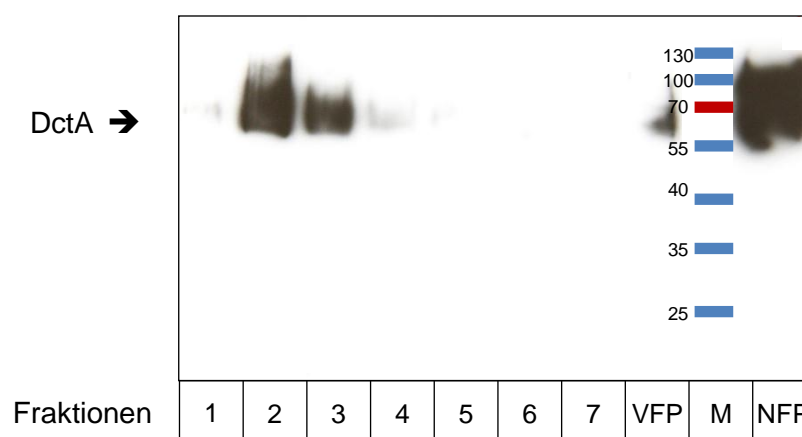


Abb. 71: **Fraktionierung des Zellhomogenats von DctA<sub>1-28</sub>-PhoA (pMW1141) exprimierenden Zellen (MC4100) nach Saccharosedichtgradientenultrazentrifugation.** Zucht und Nachweis erfolgten wie in Material und Methode beschrieben. 1-7 = Fraktionen 1-7, M = Marker, VFP = unaufgeschlossene Zellen, NFP = Zellhomogenat.

DctA<sub>1-28</sub>-PhoA sollte ein Molekulargewicht von ungefähr 57 kDa besitzen. Auf der entsprechenden Höhe war eine einzelne starke Bande in den Fraktionen 2 und 3 zu erkennen, jedoch nicht in Fraktion 1 und 4-7. DctA<sub>1-28</sub>-PhoA wurde also fast vollständig in die Membran integriert und enthielt weder aggregierte Anteile, noch Anteile in der löslichen Fraktion.

#### 4.12.4 Nachweis der Membranintegration von DctA durch Fluoreszenzmikroskopie

Zusätzlich zu der Saccharosedichtegradientenultrazentrifugation wurde die Membranintegration und Lokalisation der Varianten L414A, N415A und N416A durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Als Ausgangsplasmid diente der pBAD30 Vektor, in dem DctA C-terminal mit dem fluoreszierenden Protein YFP fusioniert wurde (Bauer, 2010). Das Fusionsprotein DctA-YFP komplementierte das Wachstum auf Fumarat in einem DctA-defizienten Stamm und zeigte bei *in vivo* FRET-Messungen eine Interaktion mit DcuS (Bauer, 2010; Witan et al., 2012).

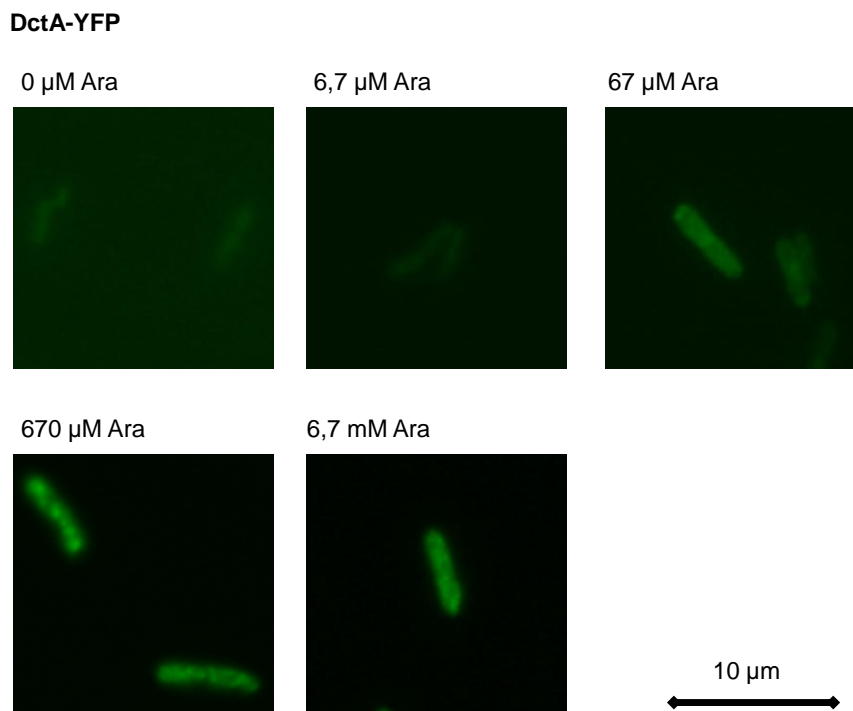


Abb. 72: **Expression von DctA-YFP (pMW526) in Abhängigkeit von der Induktionskonzentration.** Für die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie wurde das DctA-YFP Plasmid im *E. coli* Stamm MC4100 mit verschiedenen L-Arabinose (Ara) Konzentrationen (0-6,7 mM) exprimiert. Nach Wachstum bis zu einer  $OD_{578nm} = 0,5-0,7$  bei 30°C wurde die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Expressionsstärke gemessen.

Die Fluoreszenz basiert auf Anregung des Fluorophors durch monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Fluorophore gehen wieder in den ursprünglichen Zustand über und geben die Energie als Licht ab, das gemessen werden kann. DctA-YFP wurde mit verschiedenen Induktorkonzentrationen von 0-6,7 mM L-Arabinose induziert und die Fluoreszenz beobachtet. Ohne Induktor war eine schwache Hintergrundfluoreszenz zu detektieren (Abb. 72). Mit steigender L-Arabinosekonzentration verstärkte sich diese und erreichte ihr Maximum bei einer Induktorkonzentration von 670  $\mu$ M. Stärkere Induktion führte nicht sichtbar zu einer stärkeren Fluoreszenz. Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb eine Induktion mit 670  $\mu$ M L-Arabinose gewählt. DctA-YFP als Wildtyp und die drei Varianten DctA<sub>L414A</sub>-YFP, DctA<sub>N415A</sub>-YFP und DctA<sub>N416A</sub>-YFP wurden alle auf diese Weise exprimiert und auf ihre Lokalisation überprüft (Abb. 73). Die Intensität der Fluoreszenz war in allen Varianten ungefähr vergleichbar mit der des Wildtyps. Im Gegensatz zu DcuS (polare Lokalisation, Scheu et al., 2010) zeigte DctA eine relativ gleichmäßige Verteilung in der ganzen Membran.

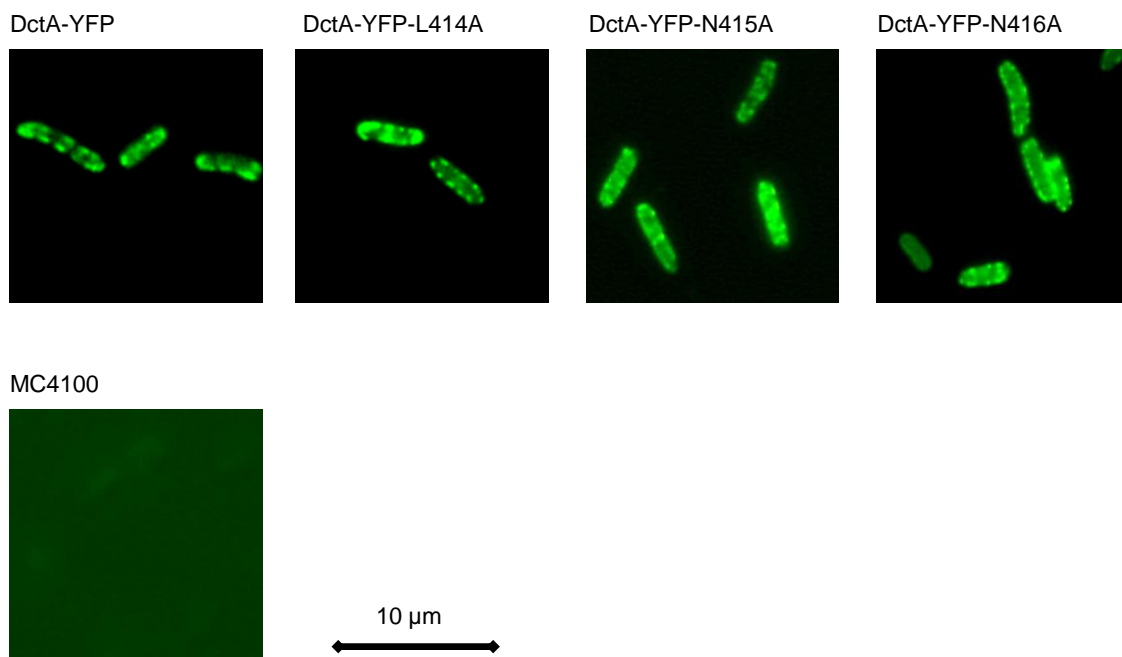


Abb. 73: **Lokalisation von DctA-YFP (pMW526) und den Varianten L414A (pMW1338), N415A (pMW1339) und N416A (pMW1340).** Für die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie wurden die DctA-Plasmide im *E. coli* Stamm MC4100 mit 670  $\mu$ M L-Arabinose exprimiert. Nach Wachstum bis zu einer  $OD_{578nm} = 0,5-0,7$  bei 30°C wurde die Fluoreszenz gemessen. DctA ist in allen Varianten in gleichem Maß und mit ähnlicher Lokalisation in der Membran integriert.

Frühere Experimente zeigten, dass DcuS-YFP polar lokalisiert, wohingegen DctA-YFP homogen in der Membran verteilt war, wenn beide Proteine getrennt exprimiert wurden. Eine Co-Expression von DcuS-CFP mit DctA-YFP führte zu einer polaren Co-Lokalisation beider Proteine (Scheu, unveröffentlicht). Die verschiedenen hier erstellten DctA-Varianten wurden daraufhin mit His-DcuS co-exprimiert (Abb. A11). Entgegen den früheren Experimenten zeigten weder der DctA Wildtyp noch eine der Varianten eine polare Lokalisation, was durch die starke Induktion von 670  $\mu$ M Arabinose bedingt sein könnte.

#### 4.13 Transkription des putativen Transporters YfcC aus *Escherichia coli*

YfcC ist ein putativer Transporter in *E. coli*. Seine Funktion ist unbekannt, doch es gab Hinweise darauf, dass YfcC ein Transporter für Acetat ist (Witan, 2008; Seidel, 2010). In dieser Arbeit wurde die Co-Expression von *yfcC* mit benachbarten Genen des Acetatstoffwechsels untersucht. Außerdem wurden das Wachstum und der Transport von *yfcC*-negativen Stämmen mit verschiedenen Substraten getestet.

Das Gen *yfcC* liegt 3' stromabwärts der beiden Gene *ackA* und *pta* (Abb. 74). Die Funktion von AckA und Pta ist die Umwandlung von Acetyl-CoA in Acetat und umgekehrt. Es sollte untersucht werden, ob *yfcC* gemeinsam mit *ackA* und *pta* oder getrennt transkribiert wird, weil Gene mit gemeinsamer metabolischer Funktion oftmals als Operon vorliegen. Dazu wurde die Gesamt-RNA des *E. coli* Stamms AJW678 isoliert und durch reverse Transkriptase in cDNA transkribiert. Mit verschiedenen Primerkombinationen, die intern in *ackA*, *pta* und *yfcC* banden, konnten die Transkriptionseinheiten bestimmt werden (Abb. 74).

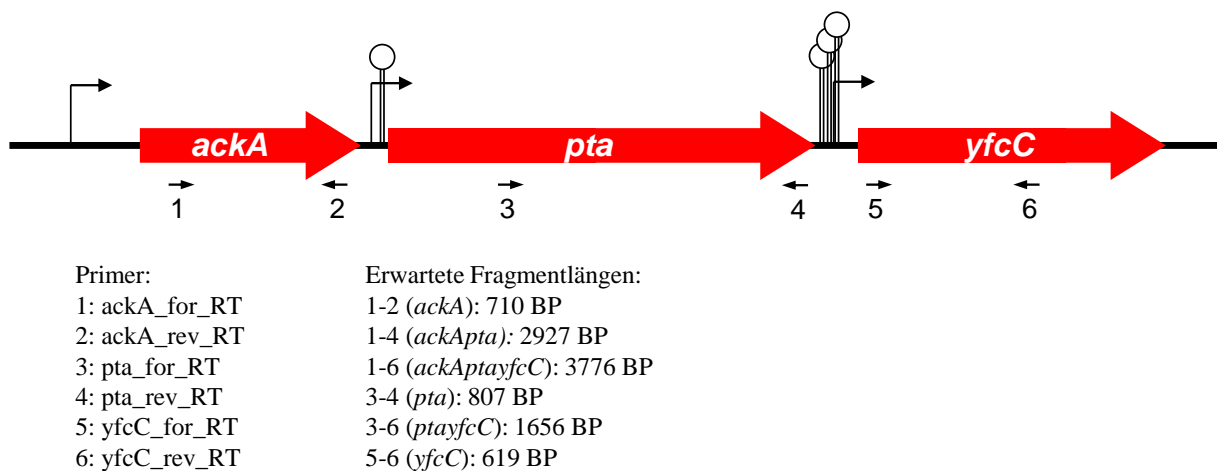


Abb. 74: **Anordnung von *ackA*, *pta* und *yfcC* in *E. coli* und Lage der Primer für die Transkriptionsanalyse.** Lage und Orientierung der Primer für die PCR und entsprechend erwartete Fragmentlängen sind in der Abbildung dargestellt.

Bei einer einzelnen Transkription von *yfcC* wäre zum Beispiel mit den Primerkombinationen 1-2 ein einzelnes Produkt mit 710 Basenpaaren (BP) Länge zu erwarten und kein Produkt mit den Kombinationen 3-6 und 1-6. Bei Co-Transkription von *yfcC* mit *pta* würde zusätzlich eine 1656 BP große Bande mit den Primern 3-6 auftreten und bei Co-Transkription mit *ackA* und *pta* in der Primerkombination 1-6 eine Bande von 3776 BP. Die tatsächlichen Ergebnisse der

PCR aus cDNA ergaben eine Co-Transkription von *yfcC* mit *pta* und eine schwächere Co-Transkription von *ackA* mit *pta* sowie *ackA* mit *pta* und *yfcC* (Abb. 75). Frühere Arbeiten belegten schon eine Co-Transkription von *ackA* mit *pta* (Kakuda et al., 1994).

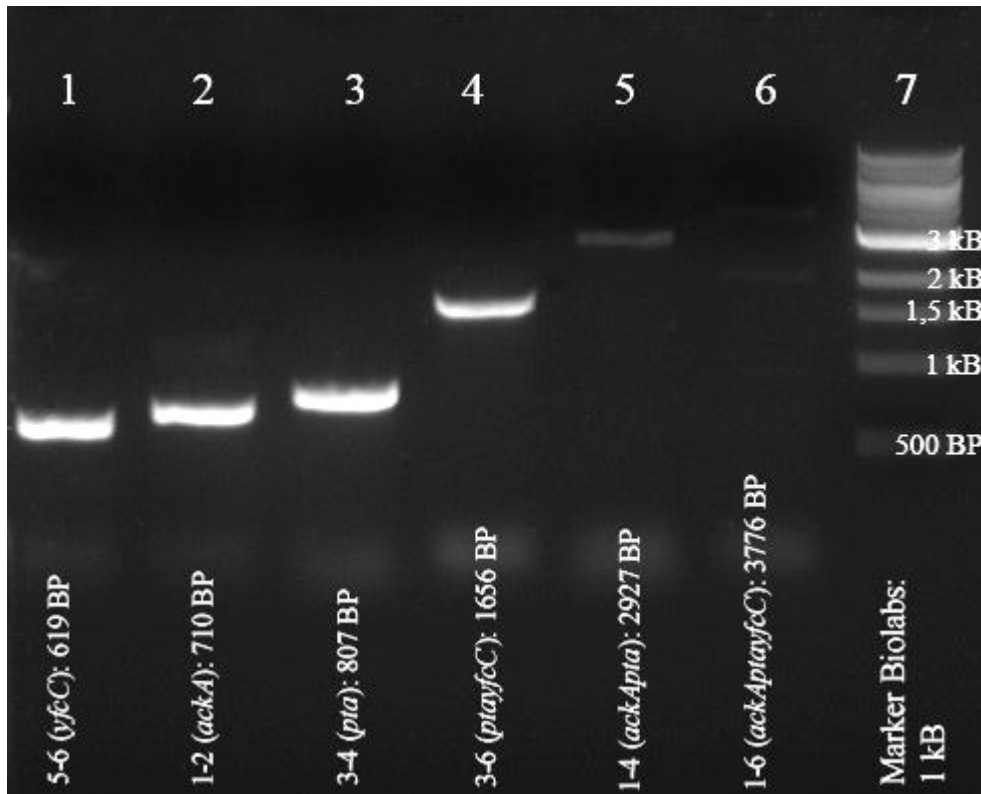


Abb. 75: Produkte der PCR von cDNA der *ackA*-, *pta*-, *yfcC*-Gene aus dem Stamm AJW678 mit verschiedenen Primerkombinationen.

#### 4.14 Wachstum von YfcC Einfach- und Mehrfachmutanten

Eine chromosomale Deletion von *yfcC* im Stamm AJW678 führte zu der *yfcC*-Einzelmutante AJW2959. Diese zeigte keine Wachstumsdefekte bei anaerobem oder aerobem Wachstum auf Glukose und aerobem Wachstum auf Acetat (Witan, 2008). Die in dieser Arbeit erstellten Mehrfachmutanten basierend auf dem Wildtyp der Keio Collection BW25113 (Baba et al., 2006) sollten mehr Aufschluss über die Funktion von *yfcC* liefern.

#### 4.14.1 Stammkonstruktion der Keio Collection *yfcC*-Einzeldelentionsmutante zu Mehrfachmutanten

Für die genauere Charakterisierung der Transportfunktion von YfcC wurden verschiedene Zweifach- und Dreifachmutanten mit *yfcC*, *atoE* und *actP* erstellt. ActP ist der einzige bisher bekannte Acetattransporter (Gimenez et al., 2003). Er ist ein hochaffiner Haupttransporter für Acetat unter aeroben Bedingungen, jedoch nicht alleine für den Acetattransport verantwortlich. AtoE ist ein mit YfcC auf Aminosäuresequenzebene verwandter Transporter, der vermutlich kurzkettige Fettsäuren transportiert. Aus den von der Keio Collection zur Verfügung gestellten Einfachmutanten wurden drei Doppel- und eine Dreifachmutante hergestellt (Abb. 76). Dabei wurde die Kanamycin-Resistenzkassette, durch die die inaktivierten Gene ersetzt wurden, zum Zweck der Erstellung von Mehrfachmutanten nach Datsenko und Wanner (2000) in einer Mutante entfernt. Die Inaktivierung eines weiteren Gens geschah durch Transduktion des durch die Kanamycin-Resistenz ersetzten Gens mit rekombinanten P1kc-Phagen. Die neuen Mutanten wurden durch die Kanamycin-Resistenz selektiert und mittels PCR überprüft (Daten nicht gezeigt).

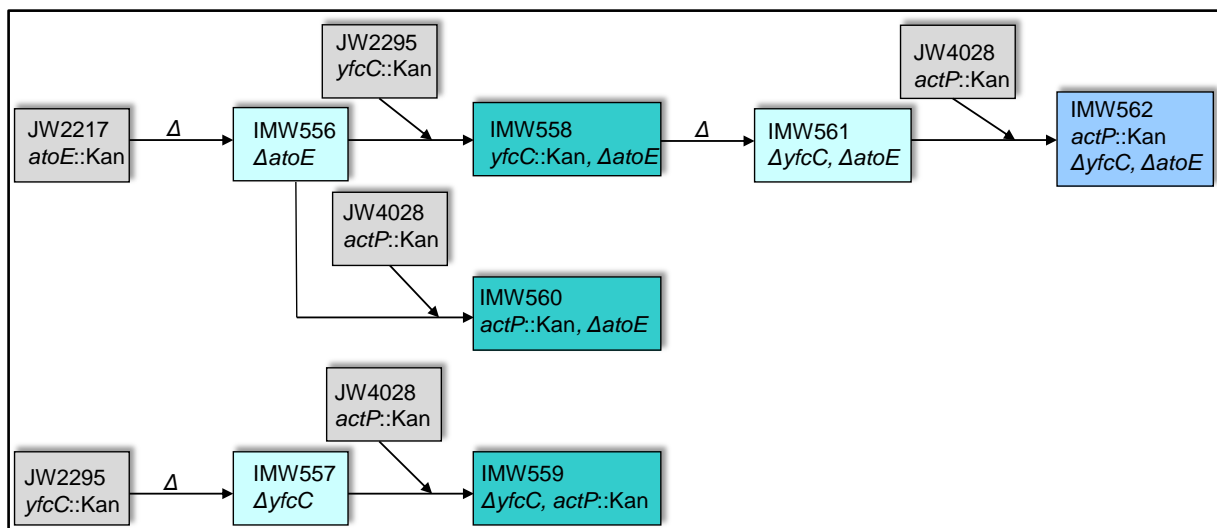


Abb. 76: **Konstruktionsstrategie für die Erstellung von *yfcC* Doppel- und Dreifachmutanten.** In den von der Keio Collection bereitgestellten Ausgangsstämmen (JW2217, JW2295, JW4028) sind die entsprechenden Gene (*atoE*, *yfcC*, *actP*) durch eine Resistenzkassette (Kan) ersetzt worden. Als Wildtypstamm diente BW25113 der Keio Collection. Die Resistenzkassette wurde für die Erstellung von Mehrfachmutanten nach Datsenko und Wanner eliminiert. Zusätzliche Geninaktivierungen wurden anschließend durch P1-Transduktion erstellt, über die Resistenz selektiert und mit PCR überprüft.

#### 4.14.2 Stammspezifische Unterschiede im Wachstum von YfcC-negativen Stämmen

Die so erstellten Stämme wurden auf ihr Wachstum unter verschiedenen Bedingungen überprüft. Die YfcC-negative Einzelmutante der Keio Collection YfcC<sup>-</sup> wuchs aerob in Minimalmedium (eM9) mit 50 mM Glukose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle etwas langsamer als der Wildtyp BW25113. Der Unterschied betrug aber weniger als 20 % (Abb. 77A). Der Wildtypstamm der AG Wolfe AJW678 hingegen wuchs so schnell wie die entsprechende YfcC-negative Mutante. Allerdings war das Wachstum der Wolfe Stämme wesentlich langsamer als das der Keio Stämme. So betrug die OD<sub>578nm</sub> der Wolfe Stämme nach neun Stunden Wachstum nur 25 % von der des Keio Wildtypstamms.

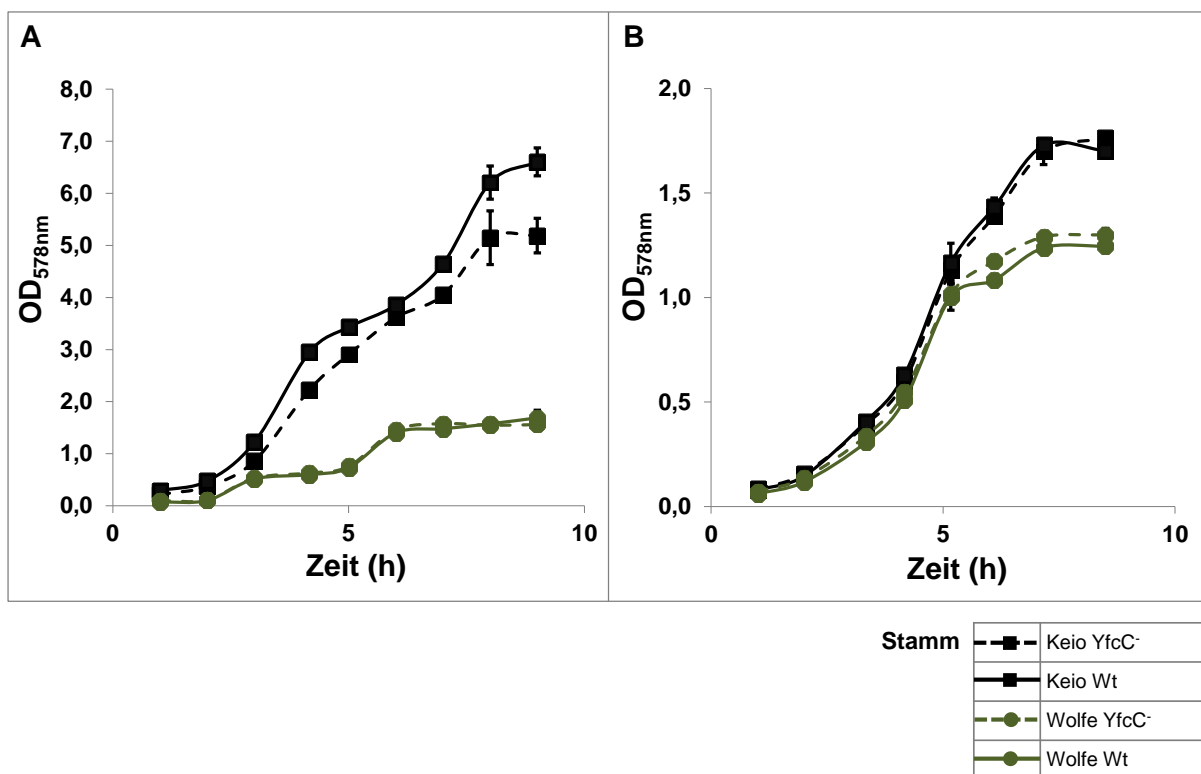


Abb. 77: **Aerobes (A) und anaerobes (B) Wachstum von YfcC-Mutanten auf 50 mM Glukose.** Das Wachstum der YfcC<sup>-</sup> Einzelmutante der Keio Collection Keio YfcC<sup>-</sup> (JW2295) wurde mit dem entsprechenden Wildtypstamm Keio Wt (BW25113) verglichen. Der alternative Wildtypstamm Wolfe Wt (AJW678) wurde ebenfalls mit der Einzelmutante Wolfe YfcC<sup>-</sup> (AJW2959) verglichen.



Anaerob zeigte sich in den Keio- und Wolfe-Stämmen kein Unterschied zwischen den YfcC-negativen Mutanten und dem entsprechenden Wildtyp bei Wachstum auf Glukose (Abb. 77B). Die Stämme der AG Wolfe wuchsen nach 8,5 Stunden auf 75 % der OD<sub>578nm</sub> verglichen mit den Keio Stämmen.

Bei aerobem Wachstum in eM9 mit 50 mM Acetat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Keio- und den Wolfe-Stämmen (Abb. 78). In den Wolfe Stämmen war kein Unterschied im Wachstum zwischen der YfcC-negativen Mutante und dem Wildtyp zu erkennen. In der YfcC-negativen Mutante der Keio Collection hingegen betrug die Wachstumsrate nur 30 % im Vergleich zu dem Keio Wildtypstamm. Im Unterschied zur Zucht auf Glukose wuchs der Wolfe Wildtypstamm etwas schneller als der Keio Wildtypstamm. Der Wachstumsausfall in der Keio YfcC-Deletionsmutante trat nicht bei der Zucht mit Glycerin auf (Abb. A13); bei der Zucht auf Succinat verringerte sich die Wachstumsrate auf 60 % (Abb. A12). Dieser Wachstumsausfall konnte jedoch nicht durch die YfcC-kodierenden Plasmide pMW699, pMW716 oder pMW722 komplementiert werden (Daten nicht gezeigt).

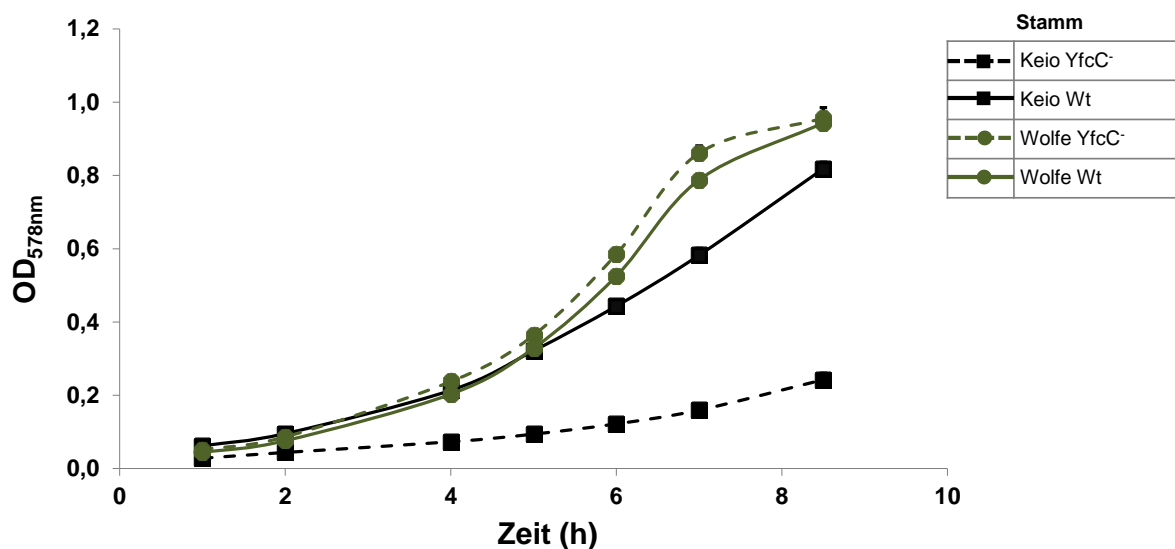


Abb. 78: **Aerobes Wachstum von YfcC-Mutanten auf 50 mM Acetat.** Das Wachstum der YfcC-Einzelmutante der Keio Collection Keio YfcC<sup>-</sup> (JW2295) wurde mit dem entsprechenden Wildtypstamm Keio Wt (BW25113) verglichen. Der alternative Wildtypstamm Wolfe Wt (AJW678) wurde ebenfalls mit der Einzelmutante Wolfe YfcC<sup>-</sup> (AJW2959) verglichen.

Somit stellte sich die Frage, worin die Ursache dieses Wachstumsunterschieds lag. Durch PCR wurde *yfcC* in beiden Stämmen verifiziert. In ihrem Genotyp sollten sich beide Stämme theoretisch nur durch die in Tab. A2 aufgeführten Mutationen unterscheiden. Keine der aufgeführten Änderungen erklärt jedoch das unterschiedliche Wachstum auf Acetat.

#### 4.14.3 Wachstum von YfcC und ActP Einfach- und Doppel-Deletionsmutanten der Keio Stämme

Das aerobe Wachstum der YfcC-Einzelmutante und einer YfcCActP-Doppelmutante wurde etwas genauer untersucht. Bei einer aeroben Zucht mit nur 2,5 mM Acetat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zeigte der YfcC-negative Stamm nur 42 % der Wachstumsrate verglichen mit dem Wildtyp. Der ActP-deletierte Stamm wuchs hingegen fast so schnell wie der Wildtyp und auch die Doppelmutante YfcCActP zeigte kein schlechteres Wachstum als die YfcC-Einzelmutante (Abb. 79A). Ein ähnliches Bild zeigte sich für das Wachstum auf 50 mM oder 2,5 mM Propionat (Abb. 79B, C). Bei aerobem Wachstum auf 50 mM (2,5 mM) Propionat hatte die Deletion von *actP* keinen Effekt, wohingegen die Deletion von *yfcC* zu einer auf 31 % (25 %) reduzierten Wachstumsrate führte. Dieser Effekt war spezifisch für kurzkettige Fettsäuren; bei Wachstum mit 50 mM Pyruvat zeigte sich kaum ein Wachstumsunterschied in den YfcC- und ActP-Mutanten (Abb. 79D).

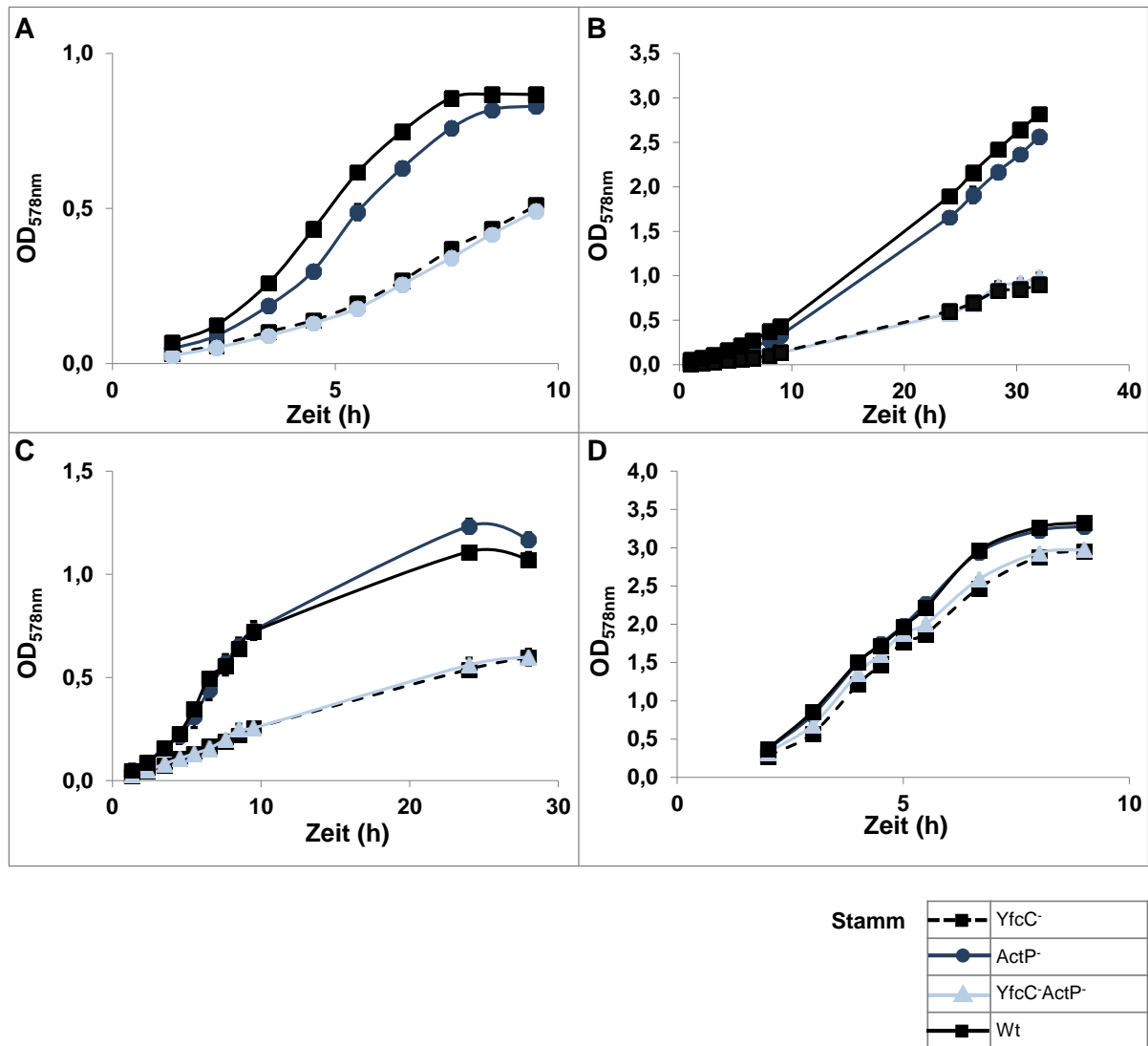


Abb. 79: **Aerobes Wachstum von Mutanten auf (A) 2,5 mM Acetat; (B) 50 mM Propionat; (C) 2,5 mM Propionat und (D) 50 mM Pyruvat.** Die YfcC<sup>-</sup> (JW2295) und ActP<sup>-</sup> (JW4028) Einzelmutanten und die Doppelmutante YfcC<sup>-</sup>ActP<sup>-</sup> (IMW559) wurden in ihrem Wachstum mit dem Wildtypstamm Keio Wt (BW25113) verglichen.

#### 4.14.4 Vergleich von YfcC-Deletionsmutanten verschiedener Stämme

Ein abschließender zusammenfassender Vergleich zeigt die drastischen Unterschiede zwischen den YfcC-Deletionsmutanten der AG Wolfe Stämme und denen der Keio Collection (Abb. 80). Während die YfcC-Deletionsmutante des Wolfe Stamms auf den untersuchten Substraten Glukose, Acetat, Glycerin und Succinat fast identisch mit dem Wildtyp wuchs, waren bei der Keio-Mutante deutliche Unterschiede zu erkennen. Anaerob mit Glukose als Substrat war das Wachstum der Keio YfcC-Deletionsmutante wildtypisch. Aerob zeigte sich ein leicht verlangsamtes Wachstum. Mit den kurzkettigen Säuren Acetat und Propionat reduzierte sich die Wachstumsrate auf nur 20-30 % des Wildtyps, mit der C<sub>4</sub>-Dicarbonsäure

Succinat lag es bei 60 %. Im Vergleich dazu zeigten sich mit den neutralen Substraten Glycerin und Pyruvat keine Unterschiede. Die Ursache für diese erheblichen Unterschiede zwischen den Keio und Wolfe Stämmen ist unbekannt.

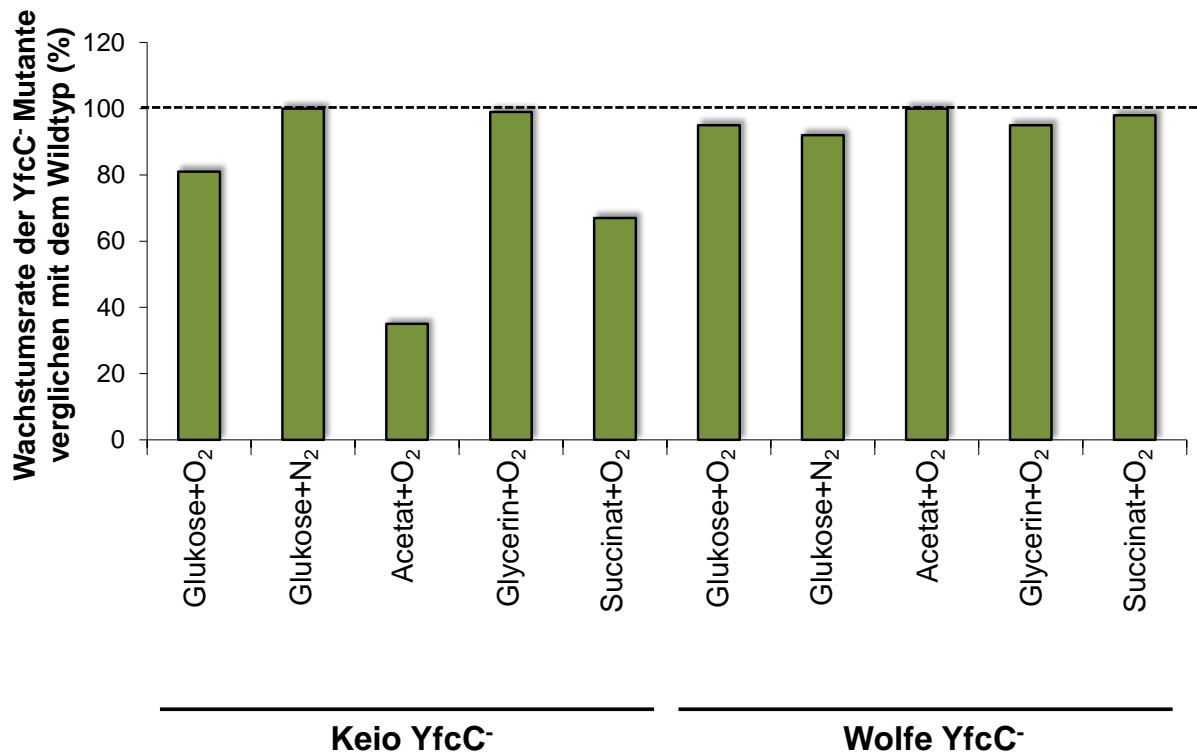


Abb. 80: **Vergleich der Wachstumsraten von YfcC<sup>-</sup> Einzelmutanten.** Die Wachstumsraten der Wildtypstämme BW25113 (Keio) und AJW678 (Wolfe) bei Zucht mit 50 mM Substrat wurden für das jeweilige Substrat bestimmt sowie die entsprechenden Wachstumsraten der YfcC<sup>-</sup> Deletionsstämme JW2295 (Keio YfcC<sup>-</sup>) und AJW2959 (Wolfe YfcC<sup>-</sup>). Anschließend wurden die Wachstumsraten der Deletionsmutanten durch die des jeweiligen Wildtypstamms dividiert und mit 100 multipliziert. Die so erhaltene Wachstumsrate der YfcC<sup>-</sup> Mutante verglichen mit dem Wildtyp unter entsprechenden Bedingungen wurde dann gegeneinander aufgetragen.

#### 4.15 Transport von [<sup>14</sup>C]-Acetat durch YfcC und ActP in Keio Stämmen

Der bekannte hochaffine Acetattransporter ActP zeigte bei seiner Deletion keinen kompletten Ausfall des Transports (Gimenez et al., 2003). Außerdem zeigte sich in den hier beschriebenen Wachstumsversuchen kein Wachstumsausfall bei Wachstum auf Acetat. Wachstumsexperimente ergaben Hinweise auf eine Rolle von YfcC als alternativen Acetattransporter zu ActP (vgl. S. 136). Um diese Hinweise zu überprüfen, wurden Transportmessungen mit YfcC<sup>-</sup>- und ActP-Deletionsmutanten durchgeführt. Hierbei wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C]-Acetat nach vorheriger aerober Zucht in Minimalmedium mit

Acetat als Substrat durch intakte Zellen gemessen. Anaerobe Zuchten der YfcC-negativen Mutante auf Glukose besaßen eine wildtypische [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetataufnahme (Daten nicht gezeigt).

#### 4.15.1 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Acetataufnahme durch YfcC

Die Aufnahme von 20  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-markiertem Acetat durch einen YfcC- und einen ActP-Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp wurde nach definierten Zeitabständen gestoppt und gemessen. Wie zuvor durch Gimenez et al. beschrieben, hatte die ActP-Deletion eine deutliche Reduzierung der Acetataufnahme zur Folge (Abb. 81).

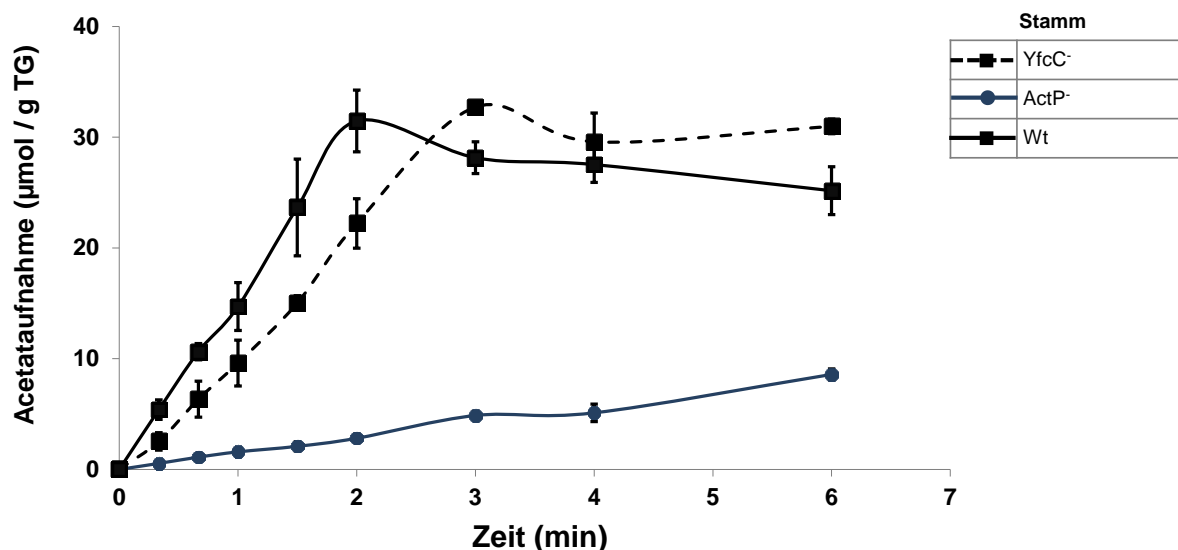


Abb. 81: Zeitabhängigkeit der Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetat durch den Wildtyp (Wt, BW25113) und die Mutanten YfcC<sup>-</sup> (JW2295) bzw. ActP<sup>-</sup> (JW4028). Die Kulturen wurden aerob in eM9 mit 50 mM Acetat bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5-0,7 gezüchtet. Die Endkonzentration an eingesetztem [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetat betrug 20  $\mu\text{M}$ .

Die YfcC Mutante zeigte eine, im Vergleich zum Wildtyp, zeitversetzte Acetataufnahme. Von Beginn an bis zu ungefähr zwei Minuten war die [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetataufnahme auf 60-75 % des Wildtyps reduziert. Sie erreichte jedoch eine Minute später eine vergleichbar hohe maximale Acetatkonzentration wie der Wildtypstamm. Dies sollte bei den weiteren Experimenten, die jeweils bei einer konstanten Inkubationszeit von 2 min mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetat durchgeführt wurden, berücksichtigt werden.

Die Acetataufnahme des Wildtyps und einer YfcC-deletierten Mutante wurde bei verschiedenen Acetatkonzentrationen nach 2 min gemessen. Acetat wurde im Wildtyp bis zu einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  in stetig steigenden Mengen aufgenommen (Abb. A14). Ab 25  $\mu\text{M}$  bis zu 100  $\mu\text{M}$  wurde nur noch wenig zusätzliches Acetat aufgenommen. Die Acetataufnahme in dem YfcC-deletierten Stamm war bei sehr niedrigen Acetatkonzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  identisch und stieg aber bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  nur leicht an. Die Differenz der Acetataufnahme des Wildtyps zu der YfcC-Mutante blieb im Bereich von 20–200  $\mu\text{M}$  relativ konstant bei  $\sim 10$  nmol / mg TG / min.

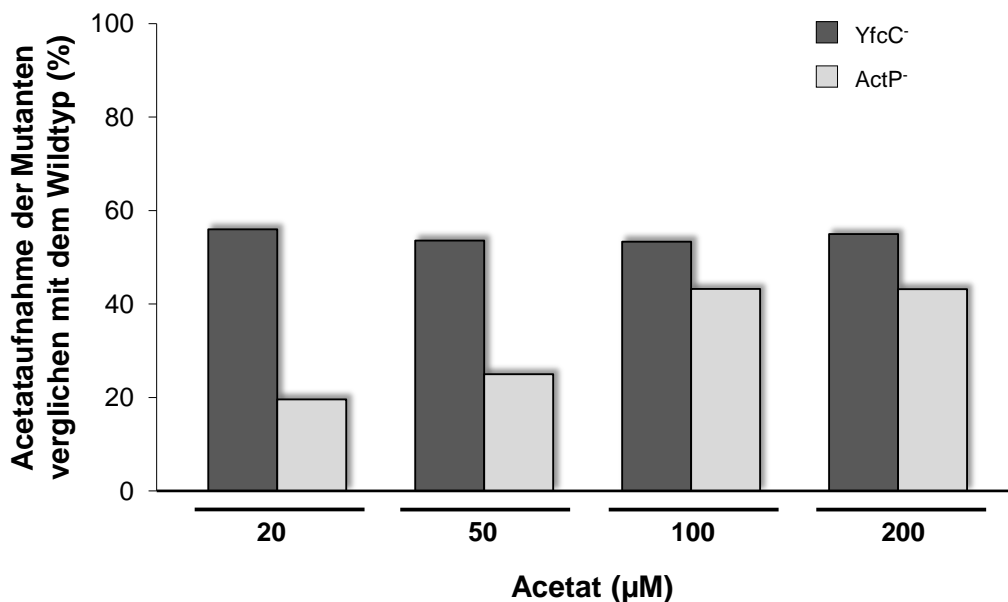


Abb. 82: **Vergleich der [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetataufnahme von YfcC<sup>-</sup> und ActP<sup>-</sup> Mutanten.** Die Inkubation in verschiedenen [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetatkonzentrationen wurde nach 2 min gestoppt. Die Acetataufnahme der Deletionsmutanten wurde durch die des entsprechenden Wildtypstamms geteilt und mit 100 multipliziert, um die Aufnahme in Prozent zu erhalten.

Die [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetataufnahme betrug hierbei in der YfcC Mutante relativ konstant 60 % von der des Wildtyps (Abb. 82). Die Aufnahme von Acetat in einem ActP-negativem Hintergrund hingegen betrug bei 20  $\mu\text{M}$  noch 20 % verglichen mit dem Wildtyp, stieg mit zunehmender Acetatkonzentration aber bis auf 40 % bei 100  $\mu\text{M}$  und blieb dann konstant. Ein Vergleich verschiedener Einfach-, Doppel- und einer Dreifachmutante von YfcC, ActP und AtoE in der Acetataufnahme sollte klären, ob der Transportverlust bei Mehrfachmutanten kumulativ ist und ob AtoE auch Acetat transportieren kann (Abb. 83). In einer AtoE-Einzelmutante wurde Acetat wie im Wildtyp aufgenommen. Auch AtoE-Doppelmutanten mit YfcC oder ActP

sowie die Dreifachmutante ließen keine Beteiligung von AtoE am Acetattransport erkennen. Wie schon erwähnt, betrug die Aufnahme von Acetat für die *yfcC*-Einzelmutante 60 % und die für die *ActP* Einzelmutante 40 % von der des Wildtyps. Der erwartete stärkere Ausfall der Acetataufnahme bei einer *YfcC*<sup>-</sup>*ActP*<sup>-</sup>-Doppelmutante blieb allerdings aus; es zeigte sich so gut wie keine Veränderung. Ebenso war in der Dreifachmutante *YfcC*<sup>-</sup>*ActP*<sup>-</sup>*AtoE*<sup>-</sup> keine geringere Acetataufnahme zu verzeichnen.

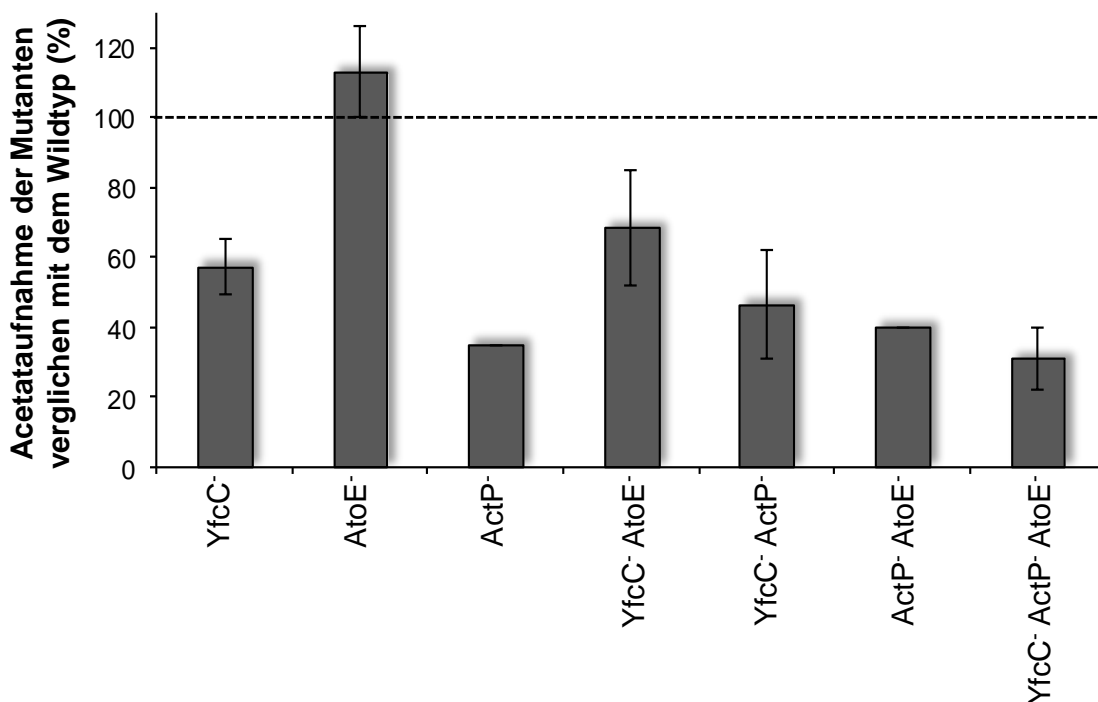


Abb. 83: Vergleich der [<sup>14</sup>C]-Acetataufnahme von verschiedenen Mutanten. Die Inkubation in 200 μM [<sup>14</sup>C]-Acetat wurde nach 2 min gestoppt. Die Acetataufnahme der Deletionsmutanten wurde durch die des Wildtypstamms geteilt und mit 100 multipliziert, um die Aufnahme in Prozent zu erhalten.

#### 4.15.2 Konkurrenz der Acetataufnahme durch einen Überschuss alternativer Substrate

Die Zugabe von alternativen Substraten als kompetitive Inhibitoren im Überschuss zu radioaktiv markiertem Acetat wurde verwendet, um weitere mögliche von *YfcC* transportierte Substanzen zu identifizieren (Abb. 84). Die Zugabe der C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren Succinat und Malat hemmte die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-Acetat; es wurden nur noch 60 bzw. 77 Prozent im Vergleich zu einer Messung ohne Kompetitor aufgenommen. Die Monocarbonsäuren Laktat, Butyrat und die C<sub>2</sub>-Dicarbonsäure Oxalat beeinträchtigten die Acetataufnahme im Wildtyp sowie in der *YfcC*-Deletionsmutante nicht. Der Überschuss von Succinat und Malat hemmte

auch die Acetataufnahme in der YfcC-Deletionsmutante leicht (um 9 bzw. 7 %). Succinat und Malat könnten also alternative Substrate für YfcC darstellen.

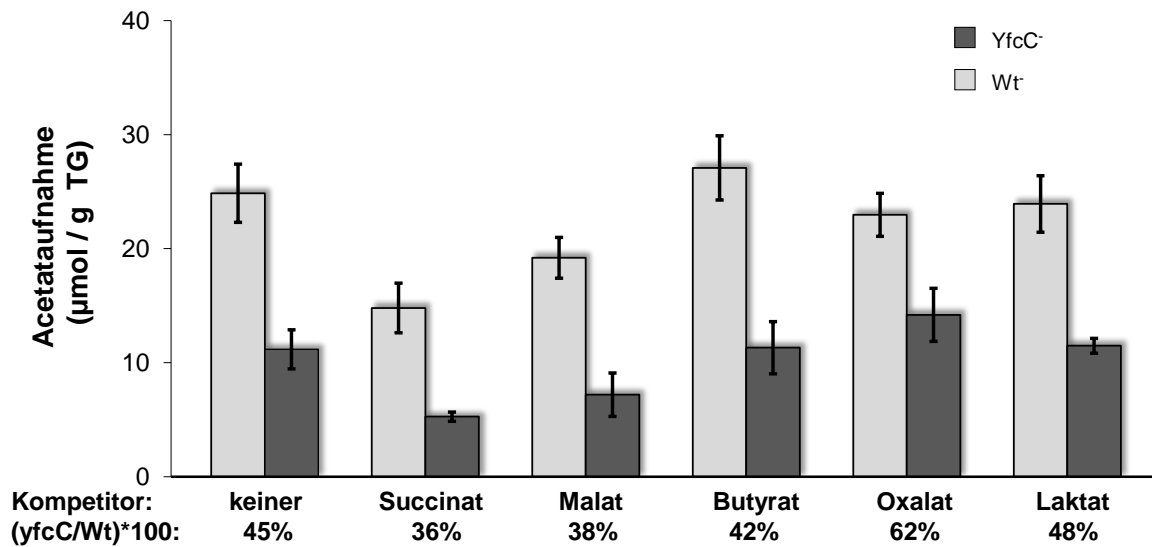


Abb. 84: **Kompetition der  $[^{14}\text{C}]$ -Acetataufnahme in YfcC<sup>-</sup> und dem Wildtyp durch verschiedene Substrate.** Die Inkubation in 20  $\mu\text{M}$   $[^{14}\text{C}]$ -Acetat wurde nach 2 min gestoppt. Kompetitoren wurden in 50-fachem Überschuss eingesetzt (1 mM).

Einen besonderen Fall stellte der Kompetitor Propionat dar. Zugabe eines Überschusses von Propionat hemmte die Aufnahme von  $[^{14}\text{C}]$ -Acetat sowohl im Wildtyp als auch in der YfcC- und der ActP-Einzelmutante fast vollständig (Abb. A15). Diese Ergebnisse stimmen mit denen früherer Experimente überein (Wagner et al., 1972). Als möglicher Grund wurde die Verwendung von Propionat als bevorzugtes Substrat angegeben, möglich wäre aber auch eine andere Art der Hemmung.



## 5 Diskussion

### 5.1 Topologie von DctA

Die Topologie von DctA wurde ausführlich mit computergestützten Algorithmen untersucht und die Ergebnisse konnten größtenteils durch experimentelle Bestimmung über LacZ- und PhoA-Fusionen bestätigt werden. Es zeigte sich eine hervorragende Übereinstimmung zwischen der experimentellen Analyse und den verschiedenen Topologiebestimmungsprogrammen in dem Bereich der N-terminalen 290 Aminosäuren von DctA. Danach gab es einen 60 Aminosäuren umfassenden Abschnitt, von Aminosäure 290 bis einschließlich Position 350, mit widersprüchlichen Vorhersagen, die in einer unterschiedlichen Lokalisation des C-Terminus in Abhängigkeit des benutzten Algorithmus resultieren. Auch die experimentellen Werte zeigten Schwankungen im Aktivitätsverhältnis in diesem Bereich (AS 323 und AS 350–380).

Durch MEMSAT SVM wurden zwei Haarnadelschleifen (HP) für die fraglichen Regionen vorhergesagt. Haarnadelschleifen durchqueren die Membran nicht vollständig, sondern treten nur teilweise in die Membran ein und verlassen sie auf der gleichen Seite wieder. Die erste HP lag laut Vorhersage in cytoplasmatischer Ausrichtung, während die zweite HP in periplasmatischer Position lag. Unterstützend zu der Berechnung von Haarnadelschleifen durch MEMSAT SVM konnte außerdem ein 3D-Modell auf Basis der Homologie zu Glt\_*Ph* erstellt werden. In Glt\_*Ph* erfolgt die Substratbindung von Aspartat oder Glutamat über zwei Haarnadelschleifen, die sich im Homologiemodell an der unsicheren Position befinden.

Bei einer Fusion von LacZ oder PhoA führte diese im Bereich der cytoplasmatischen HP1 dementsprechend zu hohen LacZ- und niedrigen PhoA-Aktivitäten. Bei HP2 wurden wechselnd höhere und niedrigere PhoA/LacZ-Verhältnisse gemessen. Die Topologie im Bereich von Haarnadelschleifen ist durch LacZ- und PhoA-Fusionen nur schwer zu bestimmen, da diese instabil in die Membran inseriert sind. Sowohl das durch Swissmodel erstellte DctA-Homologiemodell als auch die MEMSAT SVM Vorhersage sprechen jedoch stark für einen Bereich mit zwei HP, die von Transmembranhelix 7 (TM7) getrennt sind. TM7 besitzt eine gebrochene Struktur und ist deshalb in Glt\_*Ph* nicht besonders stabil (Yernool et al., 2004). Das erklärt die niedrige PhoA-Aktivität der Fusion mit der DctA Aminosäure 323, die am periplasmatischen Ende von TM7 liegt. Die Hauptunterschiede zwischen den Ergebnissen der verschiedenen zur Topologiebestimmung angewandten Methoden sind in Tab. 18 aufgeführt.

Tab. 18: Vergleich zwischen der experimentell bestimmten Topologie (PhoA/LacZ) und der durch Vorhersagen verschiedener Programme erwarteten Topologie von DctA in dem Bereich der Aminosäuren Q323 bis G350. Die Topologie ist durch C (= cytoplasmatisch), M (= membranständig) oder P (= periplasmatisch) angegeben. Als Vorhersagen wurden verwendet: TMHMM, AVEHAS, Swissmodel, MEMSAT SVM.

Fusion	PhoA/ LacZ	TMHMM	AVEHAS	Swissmodel	MEMSAT SVM
DctA1-Q323	C	C	M	P	P
DctA1-S340	C	M	M	M (HP2)	P/M (HP2)
DctA1-G350	C	P	M	M (HP2)	P/M (HP2)

Die Positionen der Aminosäuren mit fragwürdiger Lokalisation sind anhand des 3D-Modells in Abb. 85 noch einmal dargestellt. Der C-Terminus verkürzter DctA-Konstrukte, deren Aminosäuresequenz bis Q323 reicht, sollte im Periplasma liegen. Durch das Fehlen der HP2 in diesem Protein ergibt sich innerhalb von DctA jedoch eine große hydrophile Öffnung, durch welche sich eine hohe LacZ-Aktivität erklären lässt. Ähnliches gilt für S340, wobei diese Aminosäure zentral in der Membran liegt. Ebenso verhält es sich für G350. Die Werte der LacZ- und PhoA-Messungen unterstützen also die Theorie von zwei Haarnadelschleifen, die durch zwei Vorhersagen vorgeschlagen wurde. Eine Besonderheit der Topologie von Glt<sub>Ph</sub> ist die hohe Variabilität der Positionen von HP1 und HP2. Je nach Konformation können sie sich an völlig unterschiedlichen Positionen befinden (Forrest et al., 2011). Eine hauptsächlich nach innen offen vorliegende Konformation ohne Substrat (Ci-Konformation) würde sich zum Beispiel mit den scheinbar nicht passenden experimentellen Ergebnissen der Topologiebestimmung gut decken (Tab. 18, Abb. A16).

Letztendlich führten die gesammelten Ergebnisse zu dem Schluss, dass DctA aus acht Transmembranhelices und zwei zusätzlichen Haarnadelschleifen besteht. Daraus ergibt sich für DctA eine ähnliche Topologie wie für Glt<sub>Ph</sub>.

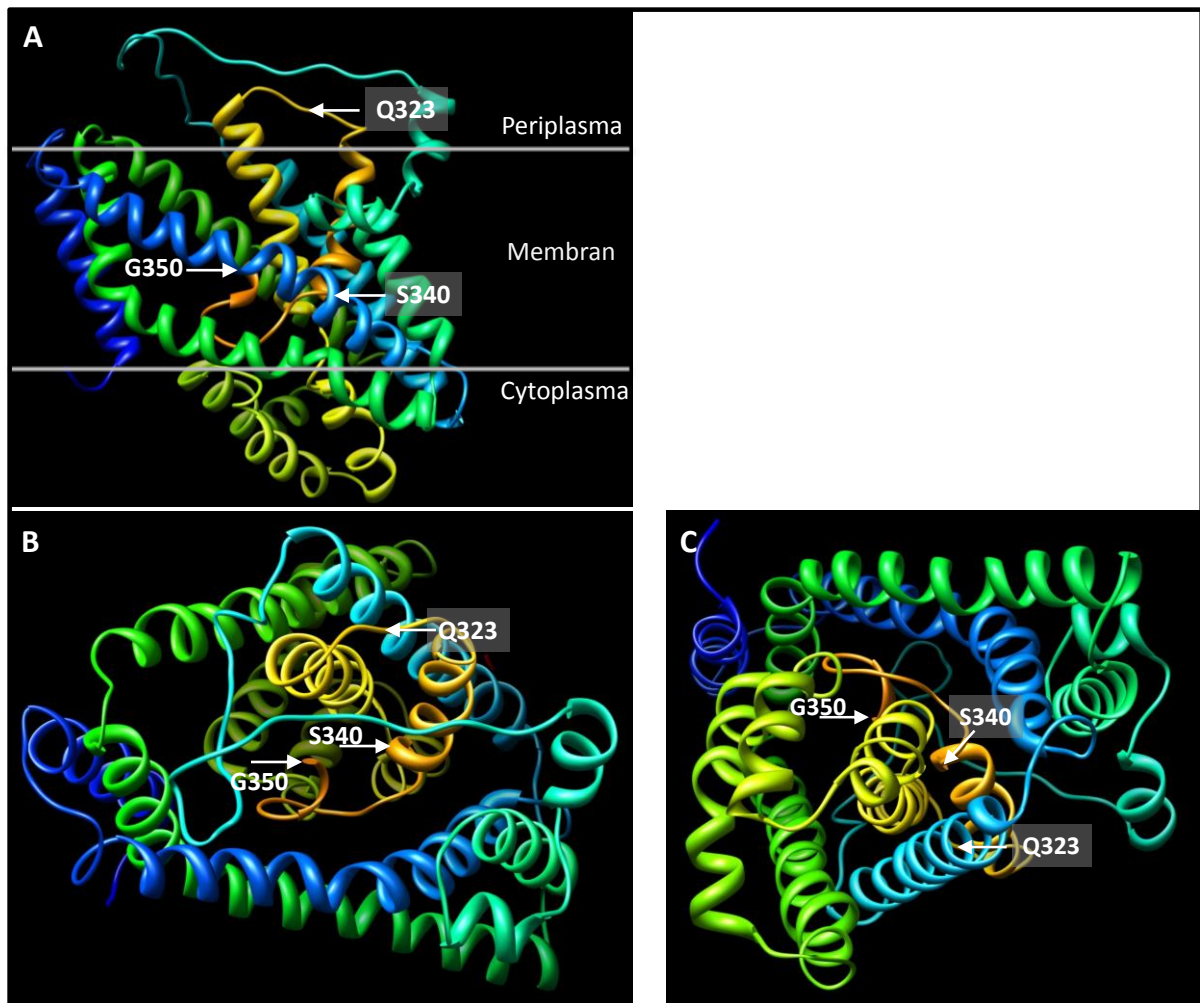


Abb. 85: Exemplarische Visualisierung der drei erstellten PhoA- und LacZ-Fusionen mit Position in HP2 von DctA. Das 3D-Modell wurde auf Grundlage der Kristallstruktur von Glt<sub>Ph</sub> mit Hilfe von Swissmodel erstellt. Gezeigt ist (A) ein Querschnitt durch die Membran mit der periplasmatischen Seite oben und der cytoplasmatischen unten; (B) die Sicht auf DctA aus dem Periplasma und (C) die Sicht auf DctA aus dem Cytoplasma.

Der Vergleich von *in silico* Vorhersagen und experimentellen Analysen führte zu einem Topologiemodell, das der Topologie von Glt<sub>Ph</sub> sehr ähnlich sieht (Abb. 86). DctA<sub>Ec</sub> besitzt 26 % identische Aminosäuren mit Glt<sub>Ph</sub>. Die ersten sechs TM von DctA<sub>Ec</sub> konnten gut belegt werden, danach machten die Vorhersageprogramme, zusammengenommen mit Sequenzvergleichen, eine einheitliche Topologie in diesem Bereich sehr wahrscheinlich. Die im Vergleich zum restlichen Protein wesentlich höher konservierte Substratbindestelle von Glt<sub>Ph</sub> liegt in dem C-terminalen Bereich mit experimentell abweichender Topologie. Laut Yernool et al. (2004) sind in Glt<sub>Ph</sub> 20 Aminosäuren an der Substratbindung beteiligt. 14 dieser Aminosäuren sind in allen fünf verglichenen Transportern, darunter drei DctA Homologe und der Glutamattransporter GltP, identisch (Abb. 86, Abb. 11). Diese

Konservierung von 65 % der Aminosäuren liegt ungefähr dreifach über dem durchschnittlichen Wert. Die übrigen sechs Aminosäuren besitzen oft noch eine strukturelle Konservierung. Der hohe Grad an Identität der substratbindenden Aminosäuren in DctA macht einen ähnlichen Mechanismus zur Substratbindung in Glt<sub>Ph</sub> und DctA sehr wahrscheinlich. Extrem konserviert sind zwei Aminosäuresequenzmotive, die zur Klassifizierung von Mitgliedern der DAACS-Familie herangezogen werden. Zum einen ist dies das NLDGT-Motiv, zum anderen das TSSS-Motiv. In DctA-Homologen zeigte sich diese Sequenz komplett konserviert, in den Glutamat-Transportern zeigte sich jeweils nur eine Abweichung (Abb. 86).

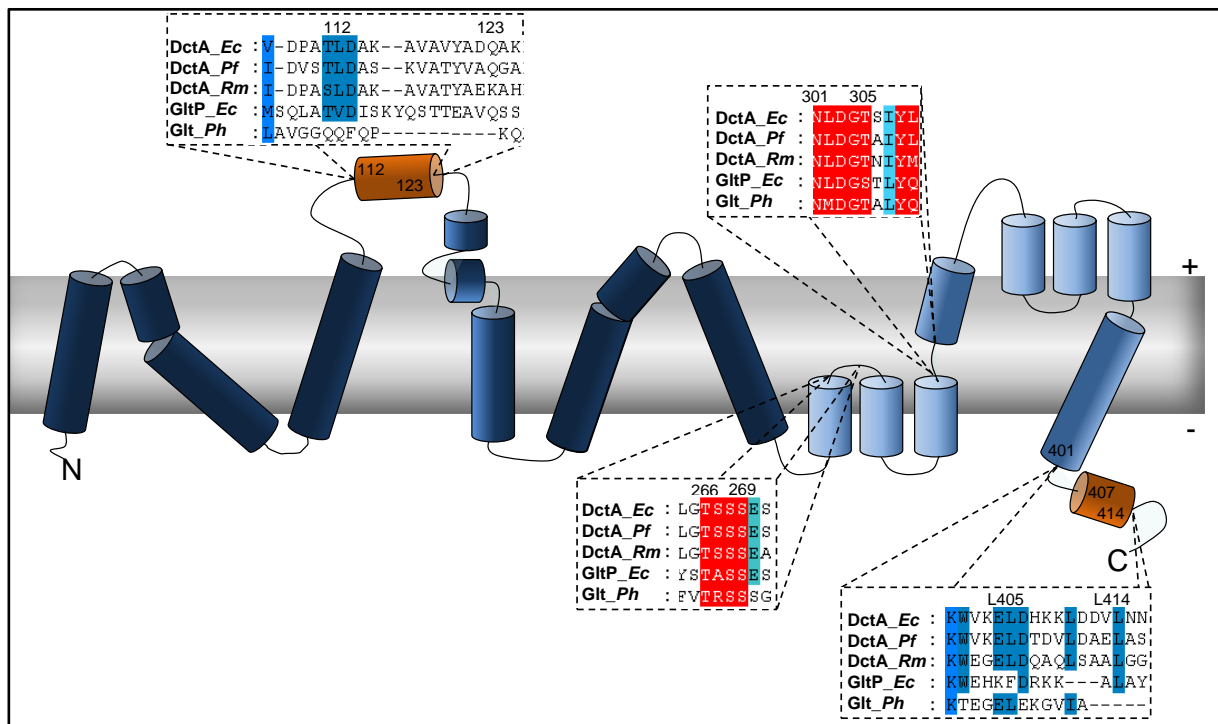


Abb. 86: Topologiemodell für DctA, basierend auf experimentellen Befunden (dunkelblau) und Vorhersagen der Glt<sub>Ph</sub> Kristallstruktur (hellblau). Orange markierte Helices sind nicht membranintegral, spezifisch für DctA und kommen nicht in Glutamat-Transportern vor. Der Sequenzvergleich zwischen DctA<sub>Ec</sub>, DctA<sub>Pf</sub>, DctA<sub>Rm</sub>, GltP<sub>Ec</sub> und Glt<sub>Ph</sub> von einigen nicht konservierten Abschnitten und von konservierten Bereichen ist an den entsprechenden Positionen angezeigt.

Im Gegensatz dazu gibt es Bereiche in DctA-Homologen, die nicht in Glutamat-Transportern konserviert sind. So ist für den Bereich der Aminosäuren 112-123 von DctA<sub>Ec</sub> eine periplasmatische Helix vorhergesagt. Dieser Bereich ist in den anderen DctA-Homologen nicht besonders gut konserviert und in Glt<sub>Ph</sub> fehlt er ganz. Der C-Terminus ab der DctA<sub>Ec</sub>

Aminosäure N415 bis zur letzten Aminosäure S428 ist nicht in DctA-Homologen und Glutamat-Transportern konserviert. Die Region davor allerdings zeigt eine Konservierung einzelner hydrophober Aminosäuren im Abstand von vier Aminosäuren in DctA-Homologen. Das Sequenzmotiv E<sub>404</sub> L<sub>405</sub> D<sub>406</sub> xxx L<sub>410</sub> xxx L<sub>414</sub> ist komplett in den drei verglichenen DctA-Proteinen konserviert.

## 5.2 Vorhersage der Tertiärstruktur und Substratbindung von DctA

Fumarat, Succinat, Malat und Aspartat hemmen die Aufnahme von radioaktiv markiertem Fumarat, Succinat oder Aspartat in DctA\_*Ec* kompetitiv (Gutowski und Rosenberg, 1975). Fumarat, Succinat, Malat, Aspartat und Orotat wurden durch Wachstumsversuche als von DctA transportierte Substrate bestätigt (Baker et al., 1996; Bauer, 2010). Es erfolgt keine Hemmung durch am  $\alpha$ -C-Atom substituierte Stoffe wie Oxalacetat,  $\alpha$ -Methylsuccinat, Itaconat, Mesaconat und Citramalat; wahrscheinlich werden diese auch nicht aufgenommen. Am C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Atom gleichzeitig in trans substituierte Stoffe wie Dihydroxymalat und Mesotartrat hemmen die Aufnahme nicht kompetitiv. Dementsprechend kann DctA L-substituierte Substrate besser aufnehmen als D-substituierte Substrate. Als Mindestanforderung von Substanzen durch DctA werden eine C<sub>4</sub>-Kette und zwei freie Carboxylgruppen benötigt. Deshalb werden Citrat und Glutamat nicht transportiert (Kay et al., 1971).

Die Struktur von vier durch DctA transportierbaren C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren (Fumarat, Succinat, Malat, L-Aspartat) ist in Abb. 87 der Struktur von zwei nicht durch DctA transportierbaren Substanzen (Oxalacetat, Glutamat) gegenübergestellt.

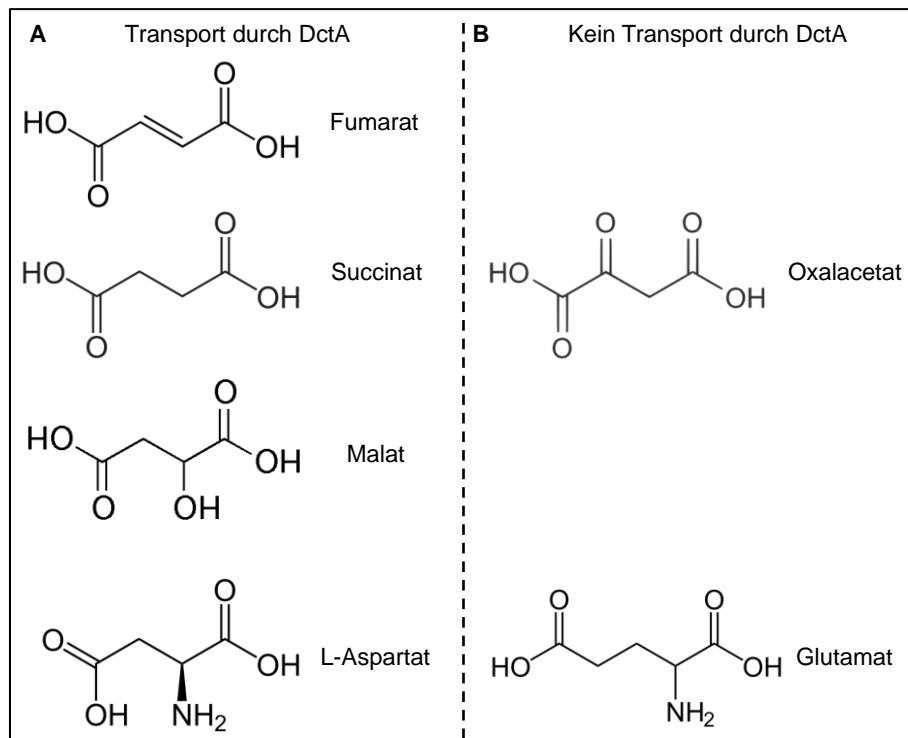


Abb. 87: **Verschiedene durch DctA transportierte (A) oder nicht transportierte (B) Substanzen.** Fumarat, Succinat, Malat und Aspartat werden durch DctA transportiert. Für Glutamat und Oxalacetat findet keine Aufnahme durch DctA statt.

Die Kristallstruktur des Transporters Glt\_*Ph* konnte mit gebundenem L-Aspartat kristallisiert werden (Boudker et al., 2007). Das für DctA erstellte 3D-Homologiemodell auf Grundlage dieser Glt\_*Ph* Struktur besitzt eine sehr ähnliche Substratbindetasche (Abb. 88). Das gebundene Substrat L-Aspartat wurde in dieses DctA 3D-Modell an die entsprechenden Koordinaten eingefügt. Wie bereits erwähnt, sind 14 von 20 in Glt\_*Ph* an der Substratbindung beteiligte Aminosäuren auch in DctA aus *E. coli* konserviert. Die Position der Seitenketten der konservierten Aminosäuren unterscheidet sich folglich in dem DctA-Modell nur minimal von Glt\_*Ph* und ist in Abb. 88 dunkelrot markiert. Man kann erkennen, dass sich L-Aspartat gut in die vorhergesagte Struktur einfügt und von den konservierten Aminosäuren umgeben ist.

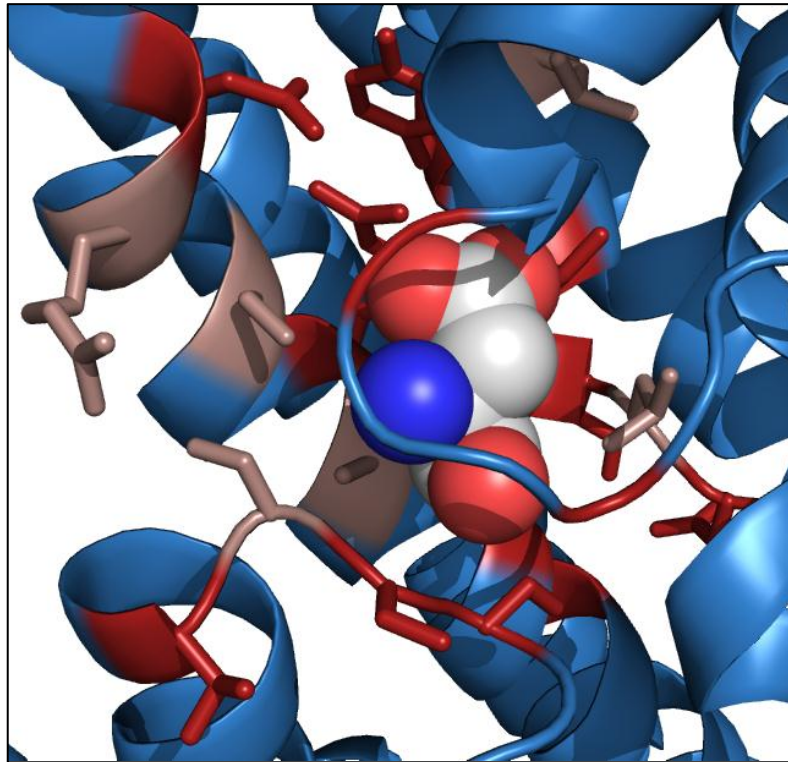


Abb. 88: **Modell für die Substratbindung von Aspartat und die Konservierung der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren.** Dargestellt ist die Substratbindetasche von DctA (blau) aus *E. coli* mit gebundenem Aspartat (Kohlenstoff = weiß, Stickstoff = dunkelblau, Sauerstoff = rot). Aminosäuren, die an der Substratbindung in *Glt\_Ph* beteiligt sind (Yernool et al., 2004; Boudker et al., 2007), sind dargestellt und farblich hervorgehoben. Aminosäuren, die laut Sequenzvergleich zwischen *Glt\_Ph* und *DctA\_Ec* identisch waren, besitzen eine dunkelrote Farbe. In *Glt\_Ph* und *DctA\_Ec* unterschiedliche Aminosäuren sind braun markiert.

Wie bei *Glt\_Ph* befinden sich auch bei *DctA\_Ec* alle an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren an der Spitze der Haarnadelschleifen HP1 und HP2 sowie in den Transmembranhelices TM7 und TM8. An der Substratbindung in *Glt\_Ph* beteiligte, aber nicht in *DctA* konservierte Aminosäuren, sind in diesem Modell braun markiert und ebenfalls mit ihrer Seitenkette dargestellt.

L-Aspartat stellt für DctA kein optimales Substrat für den Transport dar. L-Aspartat hemmt die Aufnahme von radioaktiv markiertem Fumarat oder Succinat bei fünfzigfachem Überschuss nur zu 70 %, wohingegen die Aufnahme von radioaktiv markiertem L-Aspartat durch einen Überschuss von Fumarat zu 96 % und von Succinat zu 93 % gehemmt ist (Kay et al., 1971). In Abb. 89 ist ein Modell für die Bindung von L-Aspartat (A) und Succinat (B) dargestellt. Succinat fügt sich hervorragend in die Bindetasche ein, da es bis auf ein Stickstoff- und ein Wasserstoffatom mit L-Aspartat identisch ist. Zusätzlich zu den schon in Abb. 88 gezeigten Seitenketten sind außerdem die Seitenketten der in *Glt\_Ph* vorhandenen,

an der Substratbindung beteiligten und sich von DctA unterscheidenden Aminosäuren, grau dargestellt.

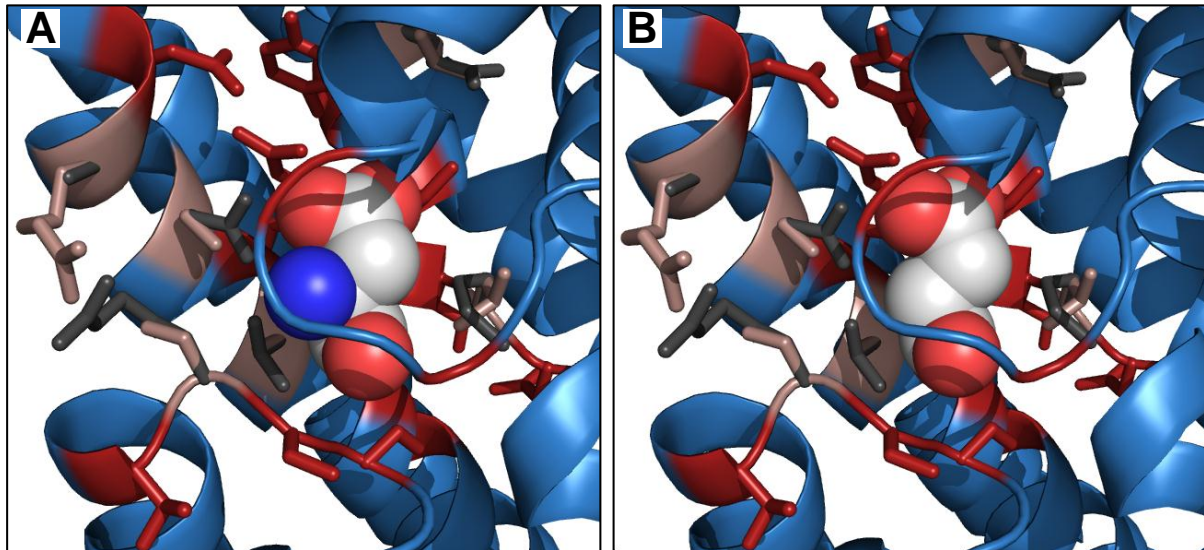


Abb. 89: **Unterschiede in der Substratbindung von DctA\_Ec und Glt\_Ph.** Dargestellt ist die Substratbindetasche von DctA (blau) aus *E. coli* mit gebundenem Aspartat (Kohlenstoff = weiß, Stickstoff = dunkelblau, Sauerstoff = rot). Aminosäuren, die an der Substratbindung in Glt\_Ph beteiligt sind (Yernool et al., 2004; Boudker et al., 2007), sind dargestellt und farblich hervorgehoben. Aminosäuren, die laut Sequenzvergleich zwischen Glt\_Ph und DctA\_Ec identisch waren, sind dunkelrot gefärbt. Unterschiedliche Aminosäuren in Glt\_Ph (grau) und DctA\_Ec (braun) sind markiert. In (A) wurde Aspartat als Substrat modelliert, in (B) Succinat.

Es ist deutlich zu erkennen, dass in diesem Modell die unterschiedlichen Aminosäuren von DctA im Vergleich zu Glt\_Ph an der Bindung des Stickstoffs beteiligt sind. Die Stickstoffgruppe wird in Glt\_Ph durch die Aminosäure Aspartat (D394) koordiniert (Yernool et al., 2004) und wahrscheinlich auch durch die Hilfe von Threonin (T398). Diese Aminosäuren sind in homologen Glutamat-Transportern (GltP\_Ec) ebenfalls konserviert, in DctA\_Ec und anderen Transportern der DctA-Familie jedoch durch Serin (S380) und Alanin (A384) ersetzt.

Glt\_Ph transportiert sowohl Aspartat als auch Glutamat im Symport mit jeweils zwei Na<sup>+</sup>-Ionen. Die Bindung der Na<sup>+</sup>-Ionen konnte aufgeklärt werden (Boudker et al., 2007; Huang et al., 2008). Vier von fünf koordinativen Aminosäureresten der Na<sup>+</sup>-Bindestelle 1 sind in Glt\_Ph und DctA\_Ec konserviert. Im Gegensatz dazu ist nur eine Aminosäure der Na<sup>+</sup>-Bindestelle 2 komplett konserviert. Die Na<sup>+</sup>-Ionenbindung wurde in das substratgebundene, auf dem Glt\_Ph Modell basierende, DctA\_Ec 3D-Strukturmodell eingefügt (Abb. 90). Beide Na<sup>+</sup>-Ionen sind nahe an das Substrat gebunden und werden durch HP1, HP2 sowie TM7



koordiniert. Das gebundene  $\text{Na}^+$ -Ion 1 (hellgrau) passt hervorragend in die modellierte Umgebung von DctA\_*Ec* und wird durch die ebenfalls in hellgrau markierten Seitengruppen der bindenden Aminosäuren S269, G297, N301, N387 und N391 in Position gebracht. Das gebundene  $\text{Na}^+$ -Ion 2 (schwarz) wird durch die Reste S299, S340, K341 und A343 in DctA\_*Ec* (T308, S349, I350 und T351 in Glt\_*Ph*) koordiniert. Aufgrund der schwachen Konservierung ist hier eine Bindung von  $\text{Na}^+$  allerdings relativ unsicher. Die Bindestelle des zweiten Ions ist in allen DctA-Homologen sowie in GltP\_*Ec* konserviert; nicht jedoch in Glt\_*Ph*. Somit würde man auch einen Co-Transport des gleichen Ions für alle DctA-Homologen sowie den Glutamat-Transporter GltP\_*Ec* erwarten. Experimentell wurde für DctA\_*Ec* ein Symport mit zwei  $\text{H}^+$  gemessen (Gutowski und Rosenberg, 1975); die hervorragende Konservierung der  $\text{Na}^+$ -Bindestelle 1 macht aber zumindest einen Co-Transport mit einem  $\text{Na}^+$ -Ion wahrscheinlich.

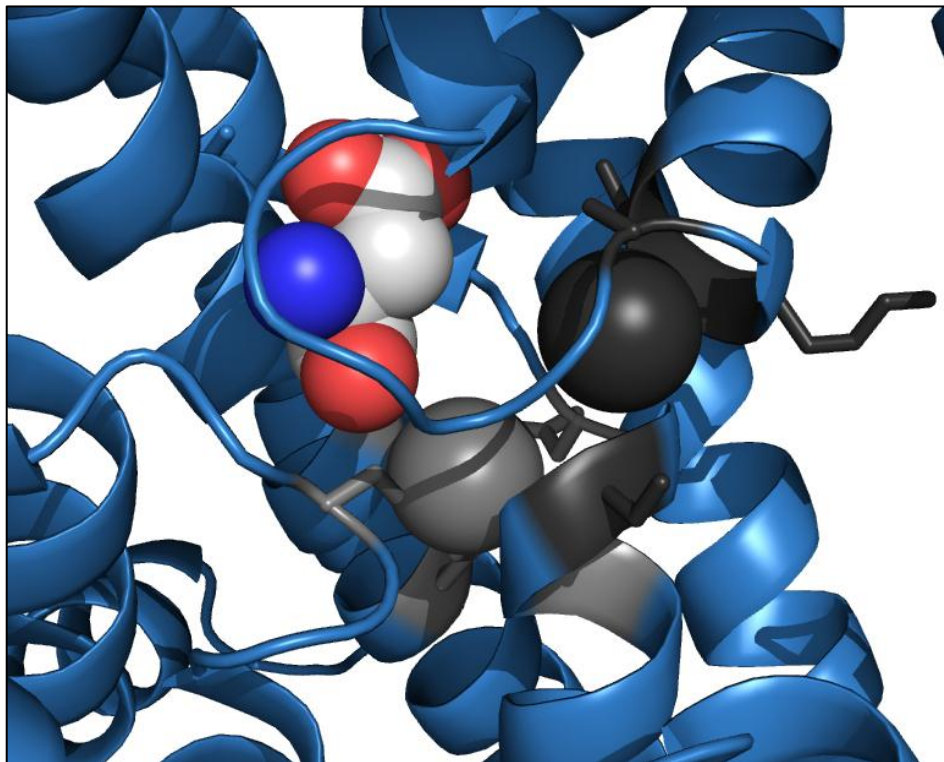


Abb. 90: **Modell für die Substratbindung von Aspartat und die Ionenkopplung mit Natrium in DctA.** Dargestellt ist die Substratbindetasche von DctA (blau) aus *E. coli* mit gebundenem Aspartat (Kohlenstoff = weiß, Stickstoff = dunkelblau, Sauerstoff = rot). Das co-transportierte Natriumion 1 ist als hellgraue, das Natriumion 2 als schwarze Kugel dargestellt. An der Natrium-Bindung beteiligte Aminosäuren sind in den entsprechenden Farben markiert. Das Modell der Natrium- und Substratbindung in DctA ist an das von Glt\_*Ph* angelehnt (Boudker et al., 2007).

Als Transportmechanismus für alle sekundären Transporter, somit auch für Glt\_*Ph*, wird von einem Modell des alternierenden Zugangs („alternating access“) ausgegangen. Diesem Modell zufolge liegt der Transporter im inaktiven Zustand in einem Gleichgewicht von einer in das Periplasma geöffneten Konformation und einer nach innen in das Cytoplasma offenen Konformation vor (Krishnamurthy et al., 2009). Die nach außen offen vorliegende Konformation von Glt\_*Ph* bindet ein Na<sup>+</sup>-Ion und ein weiteres positiv geladenes Ion. Danach erfolgt die Substratbindung, die zu einer Konformationsänderung und damit zur Öffnung des Transporters in Richtung Cytoplasma führt. Hier können das Substrat und die Ionen abgegeben werden, wodurch der Transporter die Konformation ändert und wieder von außen für neue Ionen und neues Substrat zugänglich ist. Dieses Arbeitsmodell ist auch für DctA\_*Ec* der wahrscheinlichste Transportmodus (Abb. A17).

### 5.3 Interaktionen und Funktionen von DctA

#### 5.3.1 DctA und DcuB als Co-Sensoren von DcuS

Von einer Funktion von Transportern als Co-Sensoren wird aus verschiedenen Systemen berichtet. So konnte *in vitro* eine regulatorische Protein-Protein-Interaktion zwischen CadC und LysP aus *E. coli* beobachtet werden (Abb. 91A; Tetsch et al., 2008). In Abwesenheit von Lysin interagiert der Lysintransporter LysP mit CadC. Ist Lysin vorhanden, so wird laut Modellvorstellung die Interaktion aufgelöst, Lysin transportiert und die Zielgene von CadC (*cadBA*) werden exprimiert. Eine indirekte Art der Beteiligung eines Transporters ist beim Glukose-6-Phosphat-Transport verwirklicht (Abb. 91B; Schwöppe et al., 2003). UhpC war vermutlich mal ein Transporter und kann Glukose-6-Phosphat erkennen, besitzt jedoch nur eine geringe Transportaktivität. In Anwesenheit von Glukose-6-Phosphat interagiert UhpC mit der Sensorhistidinkinase UhpB. UhpB wird phosphoryliert und leitet dieses Signal an den Transkriptionsfaktor UhpA weiter. Dieser aktiviert die Transkription des eigentlichen Transporters UhpT. Eine Protein-Protein-Interaktion wird vermutet, ist aber für dieses System nicht nachgewiesen.

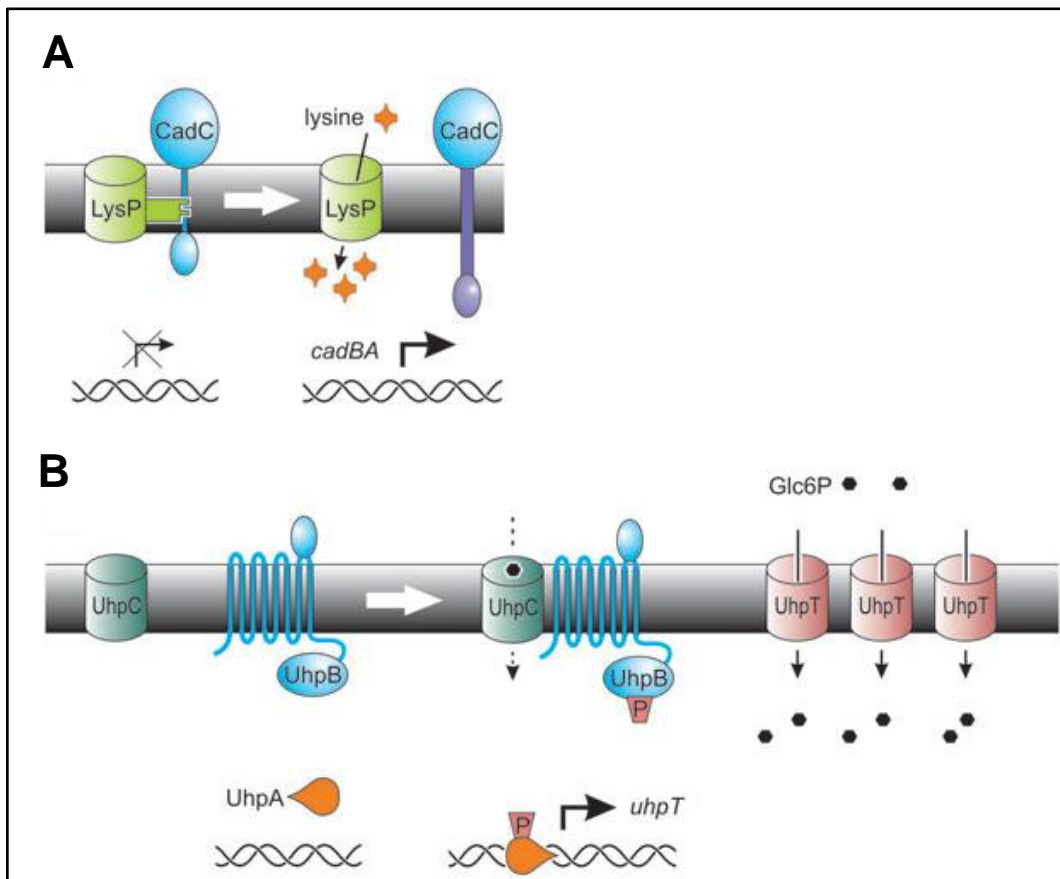


Abb. 91: **Der ToxR-ähnliche Transkriptionsfaktor CadC (A) und die Sensorhistidinkinase UhpB (B) als Co-Sensoren von sekundären Transportern in *E. coli*.** (A) Die Interaktion des Lysintransporters LysP mit CadC führt in Abwesenheit von Lysin zu einer negativen Regulation der CadC-Zielgene. (B) Die Anwesenheit von Glukose-6-Phosphat wird durch den Sensor UhpC detektiert, der daraufhin mit UhpB interagiert. Danach wird die Transkription des Glukose-6-Phosphattransporters UhpT aktiviert (Quelle: Tetsch et al., 2009).

Frühere Experimente deuteten auf eine Funktion der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter DctA und DcuB als Co-Sensoren des C<sub>4</sub>-Dicarboxylatsensors DcuS hin (Golby et al., 1999). DctA reguliert die Funktion von DcuSR aerob, während DcuB der anaerobe Co-Sensor des sowohl aerob als auch anaerob exprimierten DcuSR Zweikomponentensystems ist. Hier wurde gezeigt, dass plasmidkodiertes DctA aerob die Co-Sensorfunktion chromosomaler *dctA*-Deletionsstämme komplementierte. Ebenso konnte plasmidkodiertes DcuB die Regulation anaerob in *dcuB*-Deletionsstämmen komplementieren. Die Funktion von DcuB als Co-Sensor unter anaeroben Bedingungen wurde in einem *dcuB*-negativen Stamm durch künstlich exprimiertes DctA ersetzt. Eine Protein-Protein-Interaktion von DcuS mit DctA oder DcuB ist deshalb plausibel und ein Arbeitsmodell wurde bereits besprochen (4.2.1 DcuB und DctA als anaerobe und aerobe Co-Sensoren von DcuS).

### 5.3.2 Funktionale Protein-Protein-Interaktion von DctA mit DcuS

Die durch das Modell vorgeschlagene Protein-Protein-Interaktion zwischen DctA und DcuS konnte mit den drei unabhängigen *in vivo* Methoden FRET, BACTH und Cross-Linking nachgewiesen werden. Bei DcuS konnte die gesamte C-terminale Kinasedomäne entfernt werden, ohne dass sich Interaktionsunterschiede im BACTH-System messen ließen. Die PAS<sub>C</sub>-Domäne scheint in der DctA/DcuS-Interaktion hingegen eine Rolle zu spielen. In C-terminal fusioniertem DctA reduzierte sich die Interaktion mit C-terminal bis einschließlich der PAS<sub>C</sub>-Domäne verkürztem DcuS drastisch; mit N-terminal fusioniertem DctA blieb die Interaktion mit DcuS-TM2 erhalten. Möglicherweise interagiert der C-terminale Bereich von DctA daher mit der PAS<sub>C</sub>-Domäne von DcuS. Diese Interaktion reicht aber alleine wahrscheinlich nicht aus, da die isolierte PAS<sub>C</sub>-Domäne keine Wechselwirkung mit DctA hatte. In PAS<sub>C</sub> von DcuS gibt es verschiedene Mutanten, die einen konstitutiven Signalweiterleitungszustand (ON-Mutante) oder dessen dauerhaftes Fehlen (OFF-Mutante) verursachen. Zwei ON- und zwei OFF-Mutanten wurden auf ihre Interaktion mit DctA untersucht, aber nur die ON-Mutante N248D hatte einen permanenten Verlust der Interaktion zu Folge. Diese Mutante homodimerisierte nicht mehr; vermutlich ist der Verlust der Interaktion mit DctA durch die fehlende Oligomerisierung von DcuS bedingt.

Im BACTH-System führte die Verkürzung von DctA um mehr als 13 Aminosäuren zu einem kompletten Verlust der Interaktion mit DcuS oder DctA. Zusätzlich dazu verringerte sich die Transportfähigkeit von DctA. Schon die Mutation einzelner Aminosäuren in diesem C-terminalen Bereich von L405A, D406A und L410A führte zu einer deutlich verminderten Interaktion mit DcuS und DctA, während das Wachstum wildtypisch war. Bei Austausch der Aminosäure L414 gegen Alanin fehlten sowohl die Interaktion als auch die Transportfunktion von DctA komplett. Tauschte man L414 gegen Isoleucin aus, wurde die DctA/DctA-Interaktion reduziert, wohingegen die DctA/DcuS-Interaktion komplett erhalten blieb. Die DctA-Variante V413A verursachte bei DctA/DctA eine erhöhte Interaktion, während sich der Wert für DctA/DcuS nicht änderte. Die beiden DctA-Mutanten D411A und D412A zeigten eine stärkere Interaktion mit DcuS als der Wildtyp, jedoch keine veränderte Interaktion bei DctA/DctA Messungen. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass durch Mutation die Interaktion von DctA mit DcuS unabhängig von der DctA-Homodimerisierung beeinflusst werden kann.

Somit scheint die C-terminale Region von DctA für die Interaktion mit DcuS und DctA gleichermaßen wichtig zu sein. Ob nun die fehlende Interaktion von DcuS mit DctA durch

eine fehlende DctA-Homooligomerisierung verursacht wurde oder DcuS spezifisch mit dem C-Terminus von DctA interagiert, wurde mit verkürzten Fusionen von DctA geklärt. Es stellte sich heraus, dass die letzte Transmembranhelix inklusive des C-Terminus sowohl mit DctA als auch mit DcuS interagieren kann. Diese Interaktion war in der Mutante L414A auch in diesen Fusionen stark vermindert.

### 5.3.3 Rolle der cytosolischen Helix 8b

Für den C-terminalen Bereich von DctA ab Aminosäure K403 kann kein 3D-Homologiemodell auf der Basis von *Glt\_Ph* berechnet werden, da dieses C-terminal verkürzt kristallisiert wurde und außerdem in diesem Bereich keine Homologie zu *DctA\_Ec* besteht. Hier durchgeführte Experimente zeigten die Wichtigkeit gerade dieser C-terminalen Region für die Interaktion und Funktion von DctA als Transporter und Regulator. Die Sekundärstrukturvorhersage (PSIPRED, vgl. Abb. 12) sagte für den C-terminalen Bereich von H407 bis L414 eine alpha-Helix voraus. Um diese Vorhersage zu stärken und eine Aussage über die wahrscheinliche Lage der als wichtig identifizierten Reste L405A, D406A, L410A und L414A machen zu können, wurde eine 3D-Struktur *ab initio* mittels Quark-Server erstellt.

Bisher sind *ab initio* 3D-Strukturvorhersagen nicht für extrem hydrophobe, membranintegrale Proteine geeignet. Außerdem nimmt die Anzahl der möglichen Faltungen und damit verbunden die Ungenauigkeit der Modelle mit deren Länge zu. Deshalb wurde nur der C-terminale, cytosolisch lokalisierte DctA-Sequenzbereich berechnet (Abb. 92). Es wird eine alpha-Helix vorhergesagt, die sich für das gezeigte favorisierte Modell von L405 bis N415 erstreckt. Danach folgt ein unstrukturierter Bereich bis zur letzten Aminosäure S428. Mit der Vorhersage lässt sich der Effekt einer verringerten Interaktion der DctA-Mutationen L405A, D406A, L410A und L414A sehr gut erklären. Die Windung einer alpha-Helix um 360° entspricht drei bis vier Aminosäuren, zwei komplette Windungen entsprechen sieben Aminosäuren. Laut 3D-Modell befinden sich dementsprechend die Aminosäuren L410 und L414 auf derselben Seite der Helix. Für D406 weicht die Position leicht ab und dementsprechend für L405 etwas stärker. Diese vier für die Interaktion wichtigen Aminosäuren liegen fast in einer Ebene und bilden eine hervorragende Matrix für eine Protein-Protein-Interaktion mit einer anderen hydrophoben Helix oder mit der Membran.

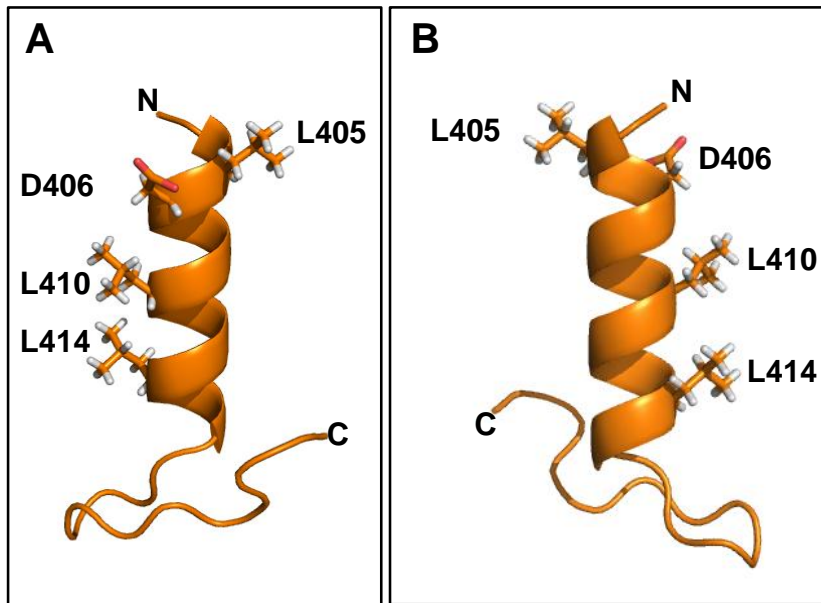


Abb. 92: 3D-Modell des C-terminalen Bereichs von DctA ab Aminosäure 403 in zwei um 180° gedrehten Ansichten (A) und (B). Der durch das Programm Quark (Zhang, unveröffentlicht) *ab initio* vorhergesagte C-terminale Bereich ist orange gefärbt. Die Aminosäuren L405, D406, L410 und L414 sind mit ihrer Seitenkette dargestellt. Substitution dieser Aminosäuren durch Alanin führte zu einem Verlust der DctA-Interaktion mit DctA und DcuS im BACTH-System.

Ein kürzlich entdecktes Beispiel für die Funktion eines cytosolisch lokalisierten C-Terminus mit regulatorischer Aktivität ist BetP. BetP ist ein Glycin-Betain-Transporter aus *Corynebacterium glutamicum*, dessen Transportaktivität durch die externe Osmolalität reguliert wird. BetP liegt als Trimer vor, wobei jedes Monomer aus 12 Transmembranhelices und einer langen cytoplasmatischen alpha-Helix besteht (Abb. 93; Ressler et al., 2009). Die alpha-Helix kann unterschiedliche Bindungen eingehen. So führt eine Protein-Lipid-Interaktion mit der in *C. glutamicum* stark negativ geladenen Membran zu einer Inaktivierung von BetP. Bei osmotischem Stress werden zuerst Kaliumionen aufgenommen, die durch Bindung an die Membran zu der Destabilisierung der Protein-Lipid-Interaktion führen. Die C-terminale alpha-Helix bindet jetzt an benachbarte Monomere des BetP-Trimers und BetP befindet sich in einem transportaktiven Zustand. Deletion der Helix führt zu einer dauerhaften, von der Osmolalität unabhängigen, Transportaktivität.

Die regulatorische Aktivität von BetP liegt im Unterschied zu der von DctA nicht auf Ebene der Genexpression, wird aber durch Protein-Protein-Interaktion einer C-terminalen, alpha-helikalen, cytoplasmatischen Domäne bedingt.

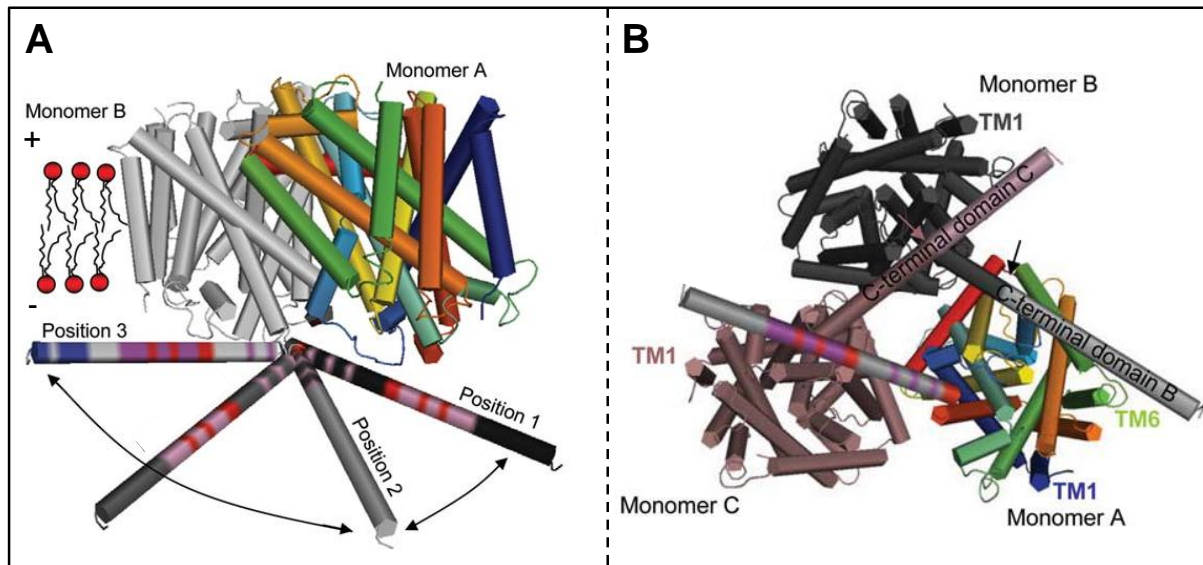


Abb. 93: **Regulatorische Aktivität der C-terminalen Domäne des Glycin-Betain Transporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum*.** (A) Schnitt durch die Membran mit verschiedenen Positionen des C-Terminus eines Monomers. (B) Sicht aus dem Cytoplasma auf ein BetP-Trimer mit den regulatorischen C-terminalen Domänen (Quelle: Krämer und Ziegler, 2009).

#### 5.3.4 Fumaratabhängigkeit der DctA/DcuS-Interaktion

Die Interaktion zwischen DctA und DcuS sollte laut Modell (S. 71) nur in der Abwesenheit von Fumarat bestehen. Wenn Fumarat vorhanden ist, müsste die Interaktion verloren gehen und DcuS somit aktiviert werden. Daraus ergibt sich dann automatisch eine konstitutive Aktivität von DcuS bei einer Deletion von DctA. Die hier durchgeführten Experimente bezüglich der Fumaratabhängigkeit der DctA/DcuS-Interaktion widersprechen diesem Modell teilweise (S. 91). Zwar zeigte sich in einigen Kombinationen wie erwartet die Abnahme der Interaktion in Anwesenheit von Fumarat; andere Kombinationen erbrachten hingegen den umgekehrten Effekt. Die Messungen waren mit relativ großen Fehlern behaftet, die Unterschiede jedoch signifikant. Deshalb wird ein neues Arbeitsmodell für die Aktivität von DctA als Co-Sensor von DcuS aufgestellt. Die Interaktion von DctA mit DcuS geht demnach in der Anwesenheit von Fumarat nicht komplett verloren. Es ändert sich lediglich die Orientierung der beiden Proteine zueinander oder die Interaktion einzelner Bereiche der Proteine (Abb. 94). Möglicherweise interagiert die C-terminale, cytosolische Helix 8b von DctA mit der cytoplasmatischen PAS<sub>C</sub>-Domäne von DcuS. Diese Interaktion wird durch Fumarat modifiziert, so dass die zur Signalweiterleitung dienende PAS<sub>C</sub>-Domäne aktiviert wird. Die Modifikation könnte durch die Transportaktivität von DctA verursacht werden. Allerdings ergibt sich aus den Experimenten mit nach der Transmembranhelix 2 verkürztem

DcuS (DcuS-TM2, Abb. 30), dass wahrscheinlich ein zusätzlicher Ort der Interaktion, möglicherweise eine Transmembranhelix, vorhanden sein muss. Im Gegensatz zu der Interaktion von DctA mit DcuS nahm die Interaktion von DctA/DctA bei der Anwesenheit von Fumarat in allen Fusionskombinationen ab.

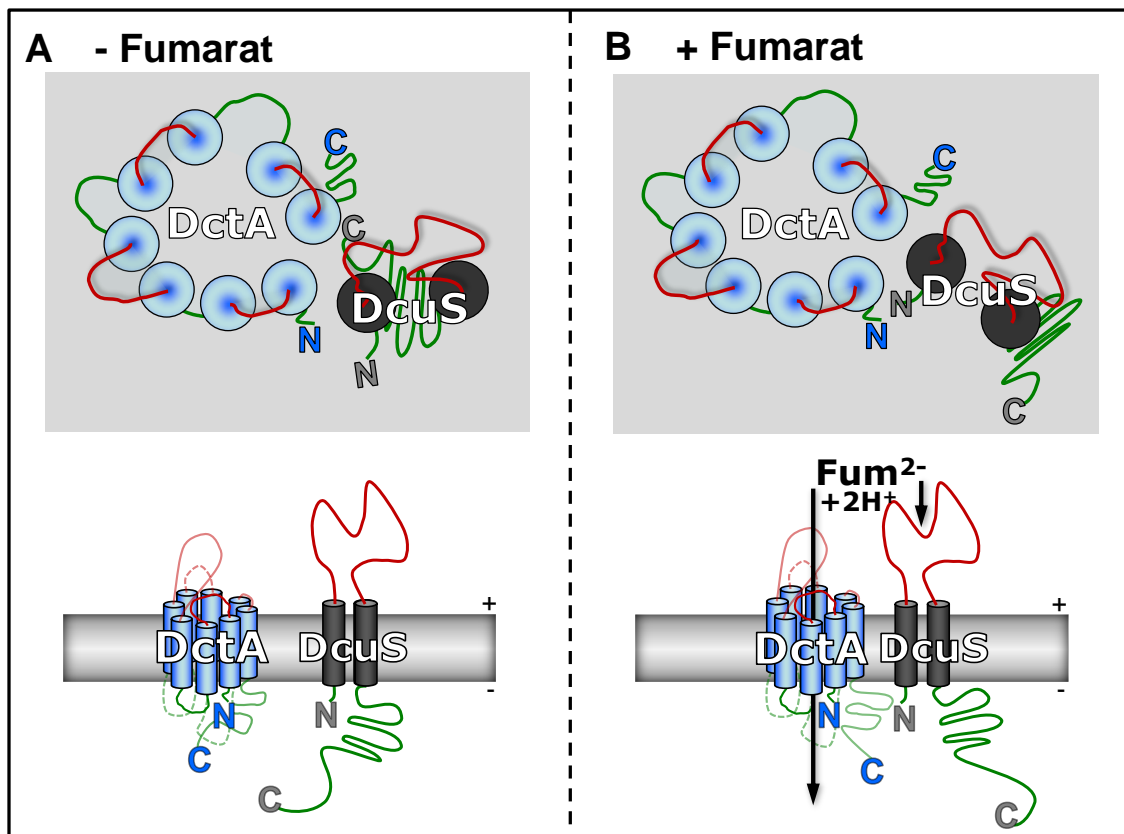


Abb. 94: **Modell der Interaktion von DctA mit DcuS in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von Fumarat.** Statt wie bisher angenommen geht die DctA/DcuS-Interaktion in Anwesenheit von Fumarat nicht komplett verloren, sondern wird nur modifiziert. Oben: Aufsicht aus dem Periplasma. Unten: Querschnitt durch die Membran. Rot: Periplasmatische Schleifen von DctA und DcuS. Grün: Cytoplasmatische Schleifen von DctA und DcuS.

### 5.3.5 Homooligomerisierung und Quartärstruktur von DctA

Interaktionsexperimente im BACTH-System zeigten eine Homomerisierung für DctA. Jedoch kann mit dem BACTH-System aufgrund seiner binären Natur nicht zwischen einer Dimerisierung und einer höheren Oligomerisierung unterschieden werden. Der Oligomerisierungsgrad kann mit SDS-PAGE bestimmt werden, wenn das zu untersuchende Protein zuvor mit einem Cross-Linker kovalent verknüpft wurde. In den hier durchgeführten Cross-Link Experimenten konnte nicht definitiv zwischen einer Dimerisierung und einer Trimerisierung



unterschieden werden (S. 125). DctA hat aufgrund seiner hohen Hydrophobizität ein anderes Laufverhalten als hydrophile Proteine in einem SDS-Gel. Die Auftrennung einer DctA-YFP enthaltenden Membranfraktion mit BN-PAGE lieferte Hinweise auf eine Trimerisierung von DctA (vorläufige Experimente, Daten nicht gezeigt). Außerdem sind alle bisher untersuchten Proteine der DAACS-Transporterfamilie, zu denen auch DctA gehört, Trimere. Dies wurde in umfangreichen Studien für die Glutamat-Transporter hEAAT2 aus *Homo sapiens* und GltP aus *Escherichia coli* (Gendreau et al., 2004) sowie GltT aus *Bacillus spec.* (Yernool et al., 2003) und DctA aus *Bacillus subtilis* (Groeneveld et al., 2010) gezeigt. Die untersuchten Proteine liefen, wie DctA auch, in einem SDS-Gel jeweils bei einem kleineren Molekulargewicht als berechnet. Für GltP aus *E. coli* zeigte sich eine monomere Bande bei 37 kDa, eine dimere Bande bei 66 kDa und eine trimere Bande bei ungefähr 95 kDa. Diese Größen sind gut vergleichbar mit den hier erhaltenen Werten für DctA\_*Ec*, das ebenfalls eine Bande bei 37 kDa und eine bei ungefähr 90 kDa zeigte. Damit handelt es sich höchstwahrscheinlich auch um ein Trimer, wobei die dimere Bande nicht beobachtet wurde.

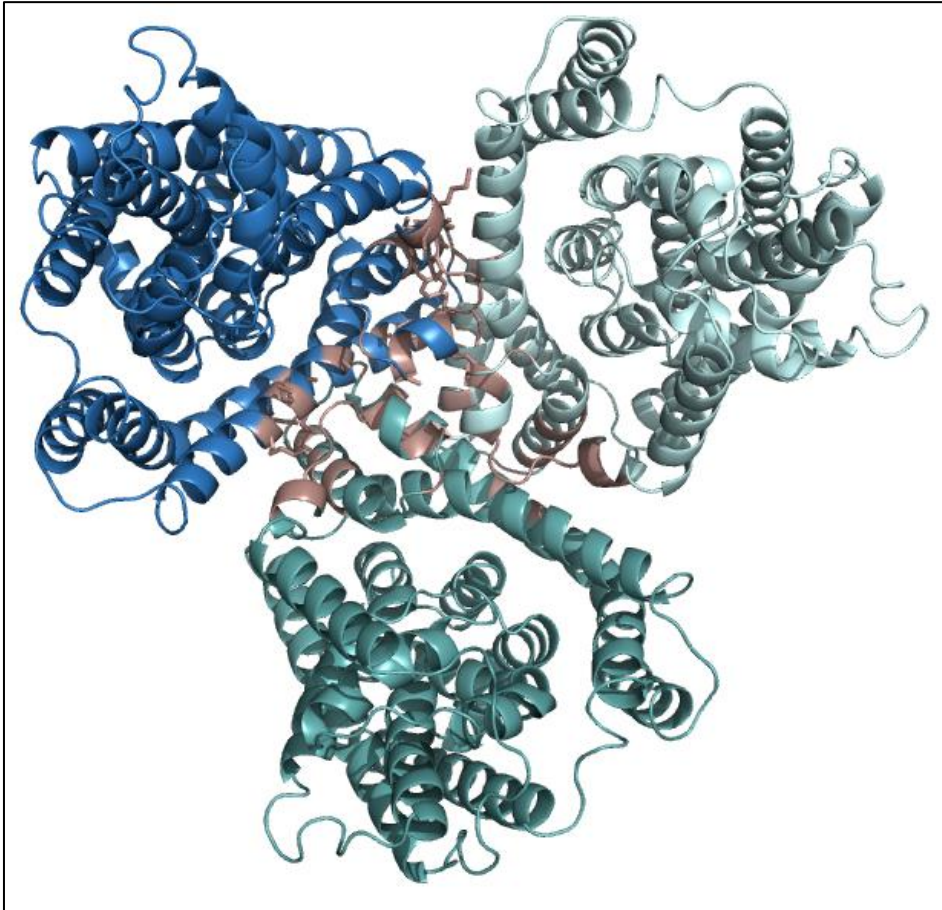


Abb. 95: **3D-Homologiemodell von DctA als Homotrimer.** Gezeigt ist die Aufsicht aus dem Periplasma. Die einzelnen DctA-Monomere sind in unterschiedlichen Blautönen gefärbt. Grundlage für die Modellierung bildete das durch Swissmodel erstellte 3D-Modell von DctA basierend auf dem Trimer Glt\_*Ph* (2NWX). Die in Glt\_*Ph* an der Trimerisierung beteiligten homologen Aminosäuren sind braun markiert.

Der DctA-Homologe Glutamat-Transporter Glt\_*Ph* verfügt ebenfalls über eine trimere Struktur (Yernool et al., 2004). Das auf der Grundlage von Glt\_*Ph* erstellte 3D-Modell von DctA ist in Abb. 95 als Trimer modelliert. Die Aufsicht zeigt, wie die drei DctA-Monomere, hier in unterschiedlichen Blautönen angefärbt, trimerisieren könnten. Die Lage der einzelnen DctA-Monomere zueinander basiert auf der Anordnung der Monomere von Glt\_*Ph* in der Kristallstruktur. In Glt\_*Ph* an der Trimerisierung beteiligte Aminosäuren wurden auf DctA übertragen und sind braun eingefärbt. Die Ansicht dieses Modells ist in Abb. 96 als Schnitt durch die Membran dargestellt. Angehängt an das DctA-Modell auf Glt\_*Ph* Homologie wurde der C-terminale Teil von DctA (orange). Allerdings erfolgten keine Berechnungen über Lage und Orientierung des C-terminalen Endes, so dass die Struktur nur als Übersicht dienen kann.

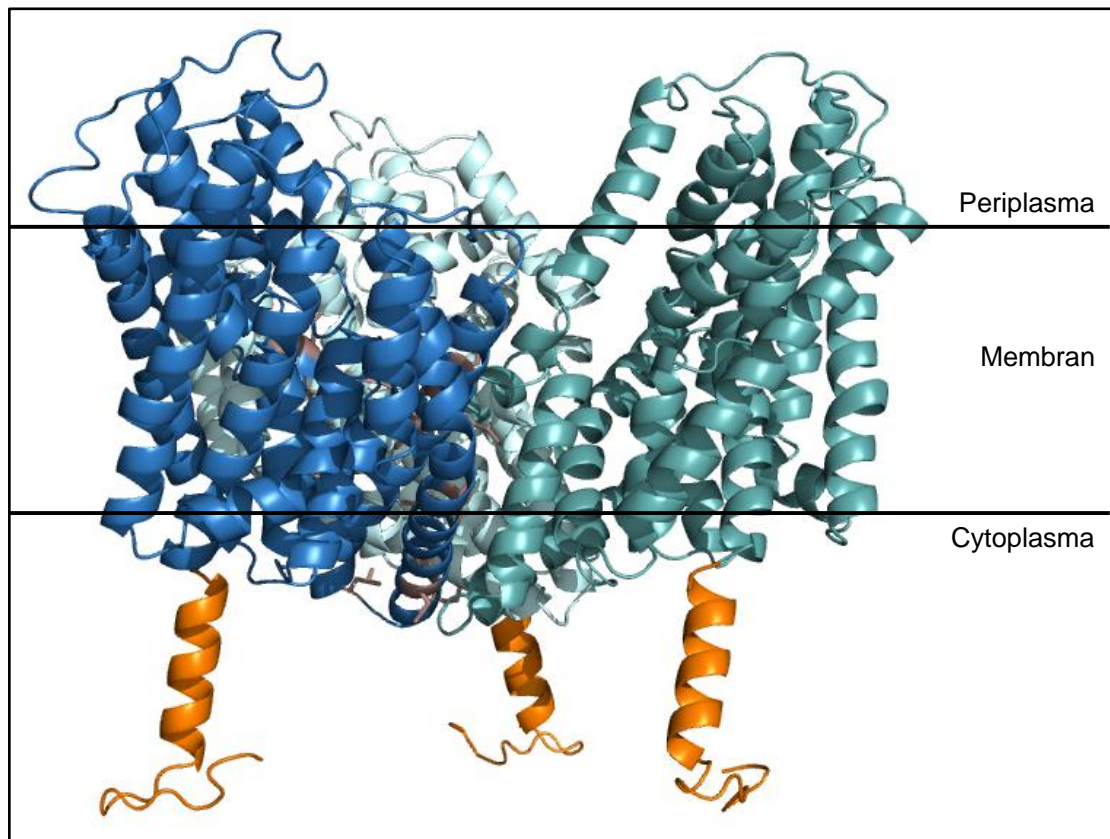


Abb. 96: **3D-Homologiemodell von DctA als Homotrimer inklusive des C-terminalen cytosolischen Bereichs.** Gezeigt ist ein Schnitt durch die Membran. Die einzelnen DctA-Monomere sind in unterschiedlichen Blautönen gefärbt. Der durch das Programm Quark (Zhang, unveröffentlicht) *ab initio* vorhergesagte C-terminale Bereich ist orange gefärbt. Grundlage für die Modellierung von DctA bildete das durch Swissmodel erstellte 3D-Modell von DctA basierend auf dem Trimer Glt\_*Ph* (2NWX). Die Lage des C-terminalen cytosolischen Bereichs relativ zu der restlichen Struktur ist willkürlich gewählt.

Möglich ist eine flexible Orientierung des C-terminalen Bereichs, zum Beispiel könnte er intern an DctA, an andere DctA-Monomere, an DcuS oder an die Membran binden. Bei Berücksichtigung der Tatsache, dass sowohl DctA als auch DcuS Homooligomere bilden, ergibt sich ein wesentlich komplizierteres Bild als in Abb. 94 dargestellt.

Unter der Annahme, dass DctA wie in Abb. 96 gezeigt permanent trimerisiert, reduzieren sich die Stellen der möglichen Interaktion enorm. Lediglich die nicht an der Trimerisierung beteiligten, nach außen zeigenden Transmembranhelices 1, 3 und 6 könnten innerhalb der Membran Interaktion mit DcuS zeigen. Ebenso besteht die Möglichkeit der Interaktion von peri- oder cytoplasmatischen DctA-Bereichen. Da DcuS ebenfalls als Dimer oder Tetramer funktional ist, sind auch hier die Interaktionsmöglichkeiten eingeschränkt. TM2 von DcuS zeigte eine Homodimerisierung, wohingegen TM1 nicht zu interagieren schien (Steinmetz, unveröffentlicht). Die PAS<sub>C</sub>-Domänen dimerisieren vermutlich ebenso, wie Struktur-

untersuchungen nahelegen (Etzkorn et al., 2008). Es wird vermutet, dass die PAS<sub>C</sub>-Domäne in der aktiven Form von DcuS auseinanderklappt und somit die Signalweiterleitung ermöglicht. Die Funktion der PAS<sub>C</sub>-Domäne liegt in der Inaktivierung der Signalweiterleitung bei Abwesenheit eines Effektors, wie Experimente zeigten (Degreif-Dünnwald., 2011).

Alle bisherigen Ergebnisse aus dieser und anderen Arbeiten wurden in ein neues Arbeitsmodell integriert (Abb. 97). In der Abwesenheit von Fumarat interagiert DctA mit DcuS über seine C-terminale cytosolische Helix 8b. Diese bindet mit der hydrophoben Interaktionsstelle an die hydrophobe Helix  $\alpha 5$  von PAS<sub>C</sub>. Die Interaktion mit DctA stabilisiert PAS<sub>C</sub> in der Abwesenheit von Fumarat, so dass es nicht zu einer Signalweiterleitung kommt (Abb. 97A).

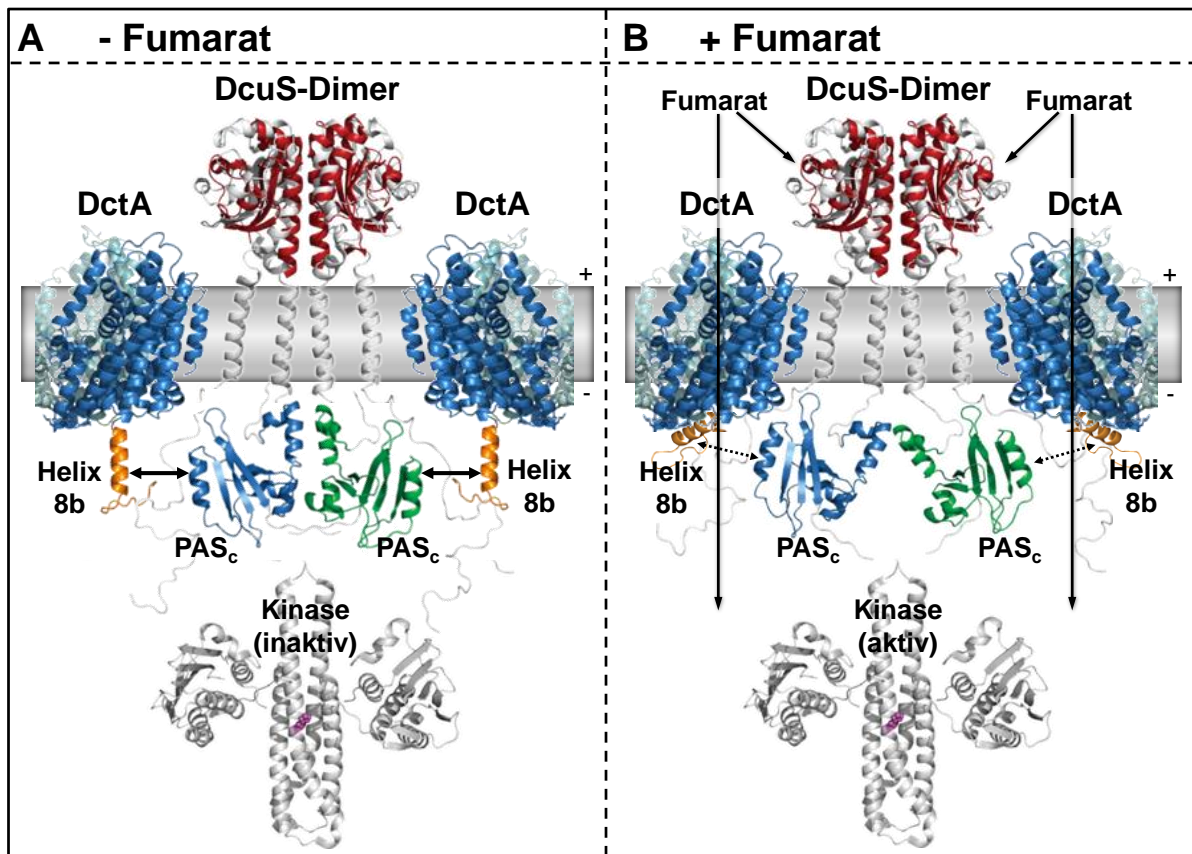


Abb. 97: **Strukturmodell der Interaktion von DctA mit DcuS in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von Fumarat.** Gezeigt ist das 3D-Strukturmodell eines DcuS-Dimers (geändert nach Etzkorn et al., 2008) mit periplasmatischer PAS<sub>P</sub>-, cytoplasmatischer PAS<sub>C</sub>- und Kinasedomäne. Das Modell von DctA (nur Monomer 1 ist komplett dargestellt) mit der cytosolischen Helix 8b ist links und rechts des DcuS-Dimers abgebildet.

Sobald Fumarat vorhanden ist, wird dieses durch  $PAS_P$  von DcuS erkannt und von DctA transportiert. Die Interaktion von Helix 8b und  $PAS_C$  wird aufgelöst und es kommt zu einer Auseinanderfaltung und Signalweiterleitung (Abb. 97B). Alternativ könnte die Interaktion auch weiterhin bestehen bleiben und die offene Struktur von  $PAS_C$  würde durch eine über den Transport von Substraten veränderte Position der Helix 8b hervorgerufen (nicht gezeigt). Die Interaktion zwischen DctA und DcuS würde nicht komplett aufgelöst, da es noch andere Interaktionsstellen zum Beispiel in der Membran geben könnte. Wird DctA deletiert, so findet keine Repression der Signaltransduktion statt und DcuS ist permanent aktiv. Bisher wurden allerdings keine ON- und nur eine OFF-Mutante im Bereich der  $PAS_C$  Helix  $\alpha 5$  gefunden, jedoch wurden auch nicht alle Aminosäuren mutiert.

#### 5.4 Interaktion und Funktion von DcuB

Für die Interaktion von DcuB mit DcuS ist die Situation ähnlich wie die für DctA/DcuS. DcuB verursachte zwar einige Schwierigkeiten bei der Expression und konnte aerob keine DctA-Deletion komplementieren, zeigte jedoch eine starke Interaktion mit DcuS. Für diesen Nachweis war eine interne Reporterproteinfusion notwendig, da sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus periplasmatisch liegen (Abb. 98; Bauer et al., 2011).

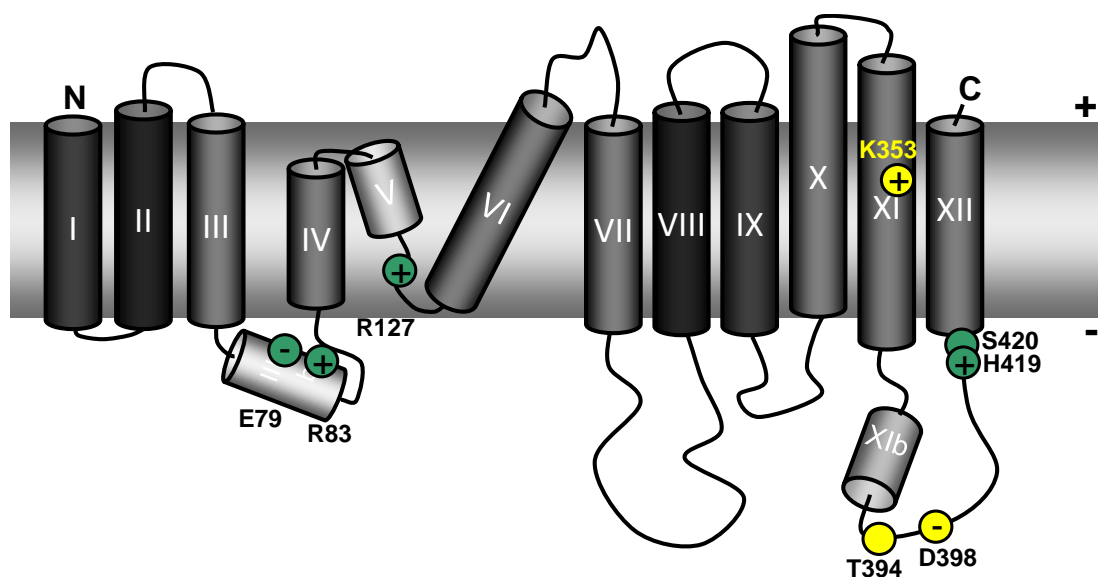


Abb. 98: Topologie von DcuB und transport (grün) relevante Aminosäuren sowie regulatorisch (gelb) relevante Aminosäuren (geändert nach Bauer et al., 2011).

Dieses sogenannte DcuB-Sandwich-Konstrukt war regulatorisch aktiv und interagiert mit DcuS, konnte jedoch kein Wachstum komplementieren. N- oder C-terminal verkürzte DcuB-Varianten zeigten keine Interaktion mehr mit DcuS. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, besitzt auch DcuB eine cytosolisch liegende, hydrophobe  $\alpha$ -Helix. Diese könnte wie bei DctA für die Interaktion verantwortlich sein, wodurch sich eine fehlende Interaktion mit DcuS in verkürzten Varianten von DcuB erklären ließe. Zwischen der den cytosolischen  $\alpha$ -Helices von DcuB und DctA besteht keine Sequenzähnlichkeit. Jedoch liegen in diesem Bereich von DcuB mehrere Aminosäuren, bei deren Mutation die regulatorische Aktivität von DcuB verloren geht (Kleefeld et al., 2009). Bei einer *ab initio* Strukturvorhersage über den Quark-Server bildet die  $\alpha$ -Helix eine hydrophobe Oberfläche aus Alaninresten. Die Alaninreste sind in DcuB-Homologen konserviert und wurden bisher nicht durch Mutagenese ersetzt. Eine Überlagerung der cytoplasmatischen  $\alpha$ -Helices von DctA und DcuB zeigte eine große Ähnlichkeit beider Strukturen (Abb. A18). Die  $\alpha$ -Helix in DcuB scheint von zwei  $\beta$ -Faltblättern flankiert zu sein; an deren Linker die beiden regulatorisch relevanten Aminosäuren T394 und D398 liegen (Abb. 99). Die Regulation der Interaktion von DcuS durch den anaerob exprimierten Transporter DcuB könnte somit sehr ähnlich zu dem in Abb. 97 gezeigten Modell verlaufen, nur unter anaeroben Bedingungen.

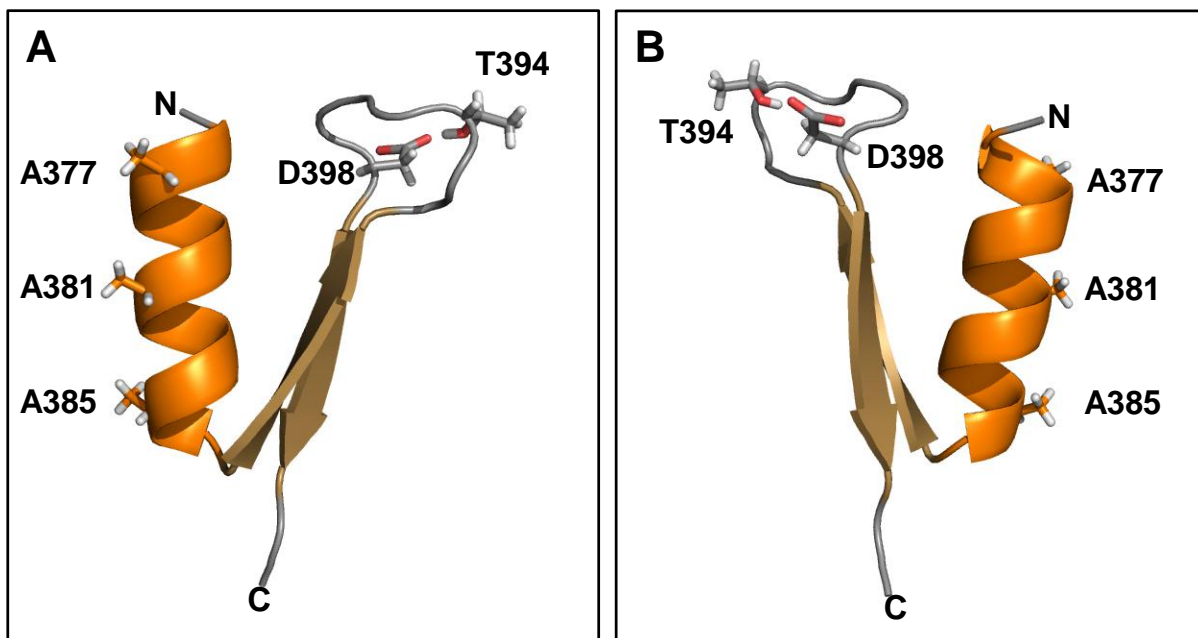


Abb. 99: **3D-Modell der Aminosäuren 375-405 von DcuB in zwei um 180° gedrehten Ansichten (A) und (B).** Die cytoplasmatische  $\alpha$ -Helix XIb ist orange, beide darauf folgenden  $\beta$ -Faltblätter sind braun gefärbt. Die Aminosäuren A377, A381, A385 der  $\alpha$ -Helix sowie die regulatorisch relevanten Aminosäuren T394 und D398 sind mit ihrer Seitenkette dargestellt. *Ab initio* Vorhersage durch Quark (Zhang, unveröffentlicht).

## 6 Literatur

- Abo-Amer, A. E.; Munn, J.; Jackson, K.; Aktas, M.; Golby, P.; Kelly, D. J.; Andrews, S. C. (2004)  
DNA interaction and phosphotransfer of the C<sub>4</sub>-dicarboxylate-responsive DcuS-DcuR two-component regulatory system from *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol* 186 (6), S. 1879–1889.
- Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. (2006)  
The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling.  
*Bioinformatics* 22 (2), S. 195–201.
- Baba, T.; Ara, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Okumura, Y.; Baba, M.; Datsenko, K. A.; Tomita, M.; Wanner, B. L.; Mori, H. (2006)  
Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.  
*Mol. Syst. Biol* 2, S. 2006.0008.
- Baker, K. E.; Ditullio, K. P.; Neuhard, J.; Kelln, R. A. (1996)  
Utilization of orotate as a pyrimidine source by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* requires the dicarboxylate transport protein encoded by *dctA*.  
*J. Bacteriol* 178 (24), S. 7099–7105.
- Baker, M. D.; Wolanin, P. M.; Stock, J. B. (2006)  
Signal transduction in bacterial chemotaxis.  
*Bioessays* 28 (1), S. 9–22.
- Bauer, J. (2010)  
The C<sub>4</sub>-Dicarboxylate Carriers DcuB and DctA of *Escherichia coli*: Function as Cosensors and Topology.  
*Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.*
- Bauer, J.; Fritsch, M. J.; Palmer, T.; Unden, G. (2011)  
Topology and Accessibility of the Transmembrane Helices and the Sensory Site in the Bifunctional Transporter DcuB of *Escherichia coli*.  
*Biochemistry* 50 (26), S. 5925–5938.
- Bernsel, A.; Viklund, H.; Hennerdal, A.; Elofsson, A. (2009)  
TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology.  
*Nucleic Acids Res* 37 (Web Server issue), S. W465-8.
- Boudker, O.; Ryan, R. M.; Yernool, D.; Shimamoto, K.; Gouaux, E. (2007)  
Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter.  
*Nature* 445 (7126), S. 387–393.
- Cherepanov, P. P.; Wackernagel, W. (1995)  
Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant.  
*Gene* 158 (1), S. 9–14.
- Cheung, J.; Hendrickson, W. A. (2008)  
Crystal structures of C<sub>4</sub>-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB.  
*J. Biol. Chem* 283 (44), S. 30256–30265.
- Cho, W.; Stahelin, R. V. (2005)  
Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking.  
*Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34, S. 119–151.
- Claros, M. G.; Heijne, G. von (1994)  
TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions.  
*Comput. Appl. Biosci* 10 (6), S. 685–686.
- Crisman, T. J.; Qu, S.; Kanner, B. I.; Forrest, L. R. (2009)  
Inward-facing conformation of glutamate transporters as revealed by their inverted-topology structural repeats.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106 (49), S. 20752–20757.

- Daley, D. O.; Rapp, M.; Granseth, E.; Melén, K.; Drew, D.; Heijne, G. von (2005)  
Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome.  
*Science* 308 (5726), S. 1321–1323.
- Darwin, A. J.; Stewart, V. (1995)  
Expression of the *narX*, *narL*, *narP*, and *narQ* genes of *Escherichia coli* K-12: regulation of the regulators.  
*J. Bacteriol* 177 (13), S. 3865–3869.
- Datsenko, K. A.; Wanner, B. L. (2000)  
One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97 (12), S. 6640–6645.
- Davies, S. J.; Golby, P.; Omrani, D.; Broad, S. A.; Harrington, V. L.; Guest, J. R.; Kelly, D. J.; Andrews, S. C. (1999)  
Inactivation and regulation of the aerobic C(4)-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol* 181 (18), S. 5624–5635.
- Degreif-Dünnwald, P. (2011)  
PAS<sub>C</sub> als signaltransduzierende Domäne des Sensorproteins DcuS von *Escherichia coli*.  
*Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Dobrovetsky, E.; Lu, M. L.; Andorn-Broza, R.; Khutoreskaya, G.; Bray, J. E.; Savchenko, A.; Arrowsmith, C. H.; Edwards, A. M.; Koth, C. M. (2005)  
High-throughput production of prokaryotic membrane proteins.  
*J. Struct. Funct. Genomics* 6 (1), S. 33–50.
- Dower, W. J.; Miller, J. F.; Ragsdale, C. W. (1988)  
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.  
*Nucleic Acids Res* 16 (13), S. 6127–6145.
- Drew, D. E.; Heijne, G. von; Nordlund, P.; Gier, J. W. de (2001)  
Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in *Escherichia coli*.  
*FEBS Lett* 507 (2), S. 220–224.
- Drew, D.; Slotboom, D.-J.; Friso, G.; Reda, T.; Genevaux, P.; Rapp, M.; Meindl-Beinker, N. M.; Lambert, W.; Lerch, M.; Daley, D. O.; van Wijk, K.-J.; Hirst, J.; Kunji, E.; Gier, J.-W. de (2005)  
A scalable, GFP-based pipeline for membrane protein overexpression screening and purification.  
*Protein Sci* 14 (8), S. 2011–2017.
- Elofsson, A.; Heijne, G. von (2007)  
Membrane protein structure: prediction versus reality.  
*Annu. Rev. Biochem* 76, S. 125–140.
- Engel, P.; Krämer, R.; 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 (17), S. 5533–5539.
- Engel, P.; Krämer, R.; Unden, G. (1994)  
Transport of C<sub>4</sub>-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*. Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux.  
*Eur. J. Biochem* 222 (2), S. 605–614.
- Etzkorn, M.; Kneuper, H.; Dünnwald, P.; Vijayan, V.; Krämer, J.; Griesinger, C.; Becker, S.; Unden, G.; Baldus, M. (2008)  
Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS.  
*Nat. Struct. Mol. Biol* 15 (10), S. 1031–1039.
- Farinha, M. A.; Kropinski, A. M. (1990)  
High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions.  
*FEMS Microbiol. Lett* 58 (2), S. 221–225.
- Feilmeier, B. J.; Iseminger, G.; Schroeder, D.; Webber, H.; Phillips, G. J. (2000)  
Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol* 182 (14), S. 4068–4076.



- Forrest, L. R.; Krämer, R.; Ziegler, C. (2011)  
The structural basis of secondary active transport mechanisms.  
*Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2), S. 167–188.
- Forrest, L. R.; Rudnick, G. (2009)  
The rocking bundle: a mechanism for ion-coupled solute flux by symmetrical transporters.  
*Physiology (Bethesda)* 24, S. 377–386.
- Forward, J. A.; Behrendt, M. C.; Wyborn, N. R.; Cross, R.; Kelly, D. J. (1997)  
TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria.  
*J. Bacteriol* 179 (17), S. 5482–5493.
- Gao, R.; Stock, A. M. (2009)  
Biological insights from structures of two-component proteins.  
*Annu. Rev. Microbiol* 63, S. 133–154.
- Gao, X.; Lu, F.; Zhou, L.; Dang, S.; Sun, L.; Li, X.; Wang, J.; Shi, Y. (2009)  
Structure and mechanism of an amino acid antiporter.  
*Science* 324 (5934), S. 1565–1568.
- Geertsma, E. R.; Groeneveld, M.; Slotboom, D.-J.; Poolman, B. (2008)  
Quality control of overexpressed membrane proteins.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (15), S. 5722–5727.
- Gendreau, S.; Voswinkel, S.; Torres-Salazar, D.; Lang, N.; Heidtmann, H.; Detro-Dassen, S.; Schmalzing, G.; Hidalgo, P.; Fahlke, C. (2004)  
A trimeric quaternary structure is conserved in bacterial and human glutamate transporters.  
*J. Biol. Chem* 279 (38), S. 39505–39512.
- Gimenez, R.; Nuñez, M. F.; Badia, J.; Aguilar, J.; Baldoma, L. (2003)  
The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol* 185 (21), S. 6448–6455.
- Golby, P.; Davies, S.; Kelly, D. J.; Guest, J. R.; 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 C<sub>4</sub>-dicarboxylates in *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol* 181 (4), S. 1238–1248.
- Golby, P.; Kelly, D. J.; Guest, J. R.; Andrews, S. C. (1998)  
Transcriptional regulation and organization of the *dcuA* and *dcuB* genes, encoding homologous anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol* 180 (24), S. 6586–6596.
- Groeneveld, M.; Weme, R. G.; Duurkens, R. H.; Slotboom, D. J. (2010)  
Biochemical characterization of the C<sub>4</sub>-dicarboxylate transporter DctA from *Bacillus subtilis*.  
*J. Bacteriol* 192 (11), S. 2900–2907.
- Gutowski, S. J.; Rosenberg, H. (1975)  
Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K12.  
*Biochem. J* 152 (3), S. 647–654.
- Guzman, L. M.; Belin, D.; Carson, M. J.; Beckwith, J. (1995)  
Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter.  
*J. Bacteriol* 177 (14), S. 4121–4130.
- Han, M. V.; Zmasek, C. M. (2009)  
phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics.  
*BMC Bioinformatics* 10, S. 356.
- Huang, S.; Ryan, R. M.; Vandenberg, R. J. (2009)  
The role of cation binding in determining substrate selectivity of glutamate transporters.  
*J. Biol. Chem* 284 (7), S. 4510–4515.
- Huang, Z.; Tajkhorshid, E. (2008)  
Dynamics of the extracellular gate an ion-substrate coupling in the glutamate transporter.  
*Biophys. J* 95 (5), S. 2292–2300.

- Iuchi, S.; Lin, E. C. (1992)  
Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol* 174 (17), S. 5617–5623.
- Janausch; Unden (1999)  
The *dcuD* (former *yhcL*) gene product of *Escherichia coli* as a member of the DcuC family of C<sub>4</sub>-dicarboxylate carriers: lack of evident expression.  
*Arch. Microbiol* 172 (4), S. 219–226.
- Janausch, I. G.; Kim, O. B.; Unden, G. (2001)  
DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*: contribution of diffusion and of alternative carriers.  
*Arch. Microbiol* 176 (3), S. 224–230.
- Janausch, I. G.; Zientz, E.; Tran, Q. H.; Kröger, A.; Unden, G. (2002)  
C<sub>4</sub>-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria.  
*Biochim. Biophys. Acta* 1553 (1-2), S. 39–56.
- Jardetzky, O. (1966)  
Simple allosteric model for membrane pumps.  
*Nature* 211 (5052), S. 969–970.
- Jensen, K. F. (1993)  
The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels.  
*J. Bacteriol* 175 (11), S. 3401–3407.
- Jones, D. T. (1999)  
Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices.  
*J. Mol. Biol* 292 (2), S. 195–202.
- Jording, D.; Pühler, A. (1993)  
The membrane topology of the *Rhizobium meliloti* C<sub>4</sub>-dicarboxylate permease (DctA) as derived from protein fusions with *Escherichia coli* K12 alkaline phosphatase (PhoA) and beta-galactosidase (LacZ).  
*Mol. Gen. Genet* 241 (1-2), S. 106–114.
- Jung, H.; Pirch, T.; Hilger, D. (2006)  
Secondary transport of amino acids in prokaryotes.  
*J. Membr. Biol* 213 (2), S. 119–133.
- Jung, H.; Rübenhagen, R.; Tebbe, S.; Leifker, K.; Tholema, N.; Quick, M.; Schmid, R. (1998)  
Topology of the Na<sup>+</sup>/proline transporter of *Escherichia coli*.  
*J. Biol. Chem* 273 (41), S. 26400–26407.
- Kakuda, H.; Hosono, K.; Shiroishi, K.; Ichihara, S. (1994)  
Identification and characterization of the *ackA* (acetate kinase A)-*pta* (phosphotransacetylase) operon and complementation analysis of acetate utilization by an *ackA-pta* deletion mutant of *Escherichia coli*.  
*J. Biochem* 116 (4), S. 916–922.
- Käll, L.; Krogh, A.; Sonnhammer, E. L. (2004)  
A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method.  
*J. Mol. Biol* 338 (5), S. 1027–1036.
- Käll, L.; Krogh, A.; Sonnhammer, E. L. (2007)  
Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server.  
*Nucleic Acids Res* 35 (Web Server issue), S. W429-32.
- Karimova, G.; Pidoux, J.; Ullmann, A.; Ladant, D. (1998)  
A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95 (10), S. 5752–5756.
- Karimova, G.; Ullmann, A.; Ladant, D. (2001)  
Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system.  
*J. Mol. Microbiol. Biotechnol* 3 (1), S. 73–82.

- Karimova, G.; Dautin, N.; Ladant, D. (2005)  
Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis.  
*J. Bacteriol* 187 (7), S. 2233–2243.
- Kaspar, S.; Bott, M. (2002)  
The sensor kinase CitA (DpiB) of *Escherichia coli* functions as a high-affinity citrate receptor.  
*Arch. Microbiol* 177 (4), S. 313–321.
- Kay, W. W.; Kornberg, H. L. (1969)  
Genetic control of the uptake of C(4)-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*.  
*FEBS Lett* 3 (2), S. 93–96.
- Kay, W. W.; Kornberg, H. L. (1971)  
The uptake of C<sub>4</sub>-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*.  
*Eur. J. Biochem* 18 (2), S. 274–281.
- Kim, O. B.; Uden, G. (2007)  
The L-tartrate/succinate antiporter TtdT (YgjE) of L-tartrate fermentation in *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol* 189 (5), S. 1597–1603.
- Kleefeld, A. (2002)  
Der Einfluss der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Carrier DcuB und DctA auf die DcuSR-abhängige Genregulation in *Escherichia coli*.  
*Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.*
- Kleefeld, A. (2006)  
Der Carrier DcuB als zweiter Sensor des Zweikomponentensystems DcuSR in *Escherichia coli*.  
*Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.*
- Kleefeld, A.; Ackermann, B.; Bauer, J.; Krämer, J.; Uden, G. (2009)  
The fumarate/succinate antiporter DcuB of *Escherichia coli* is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression.  
*J. Biol. Chem* 284 (1), S. 265–275.
- Kneuper, H. (2005)  
Struktur- und Funktionsuntersuchungen des C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Sensors DcuS von *Escherichia coli*.  
*Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.*
- Krämer, J. (2007)  
Der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat- und Citratsensor DcuS aus *Escherichia coli* – Signalerkennung und Regulation.  
*Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.*
- Krämer, J.; Fischer, J. D.; Zientz, E.; Vijayan, V.; Griesinger, C.; Lupas, A.; Uden, G. (2007)  
Citrate sensing by the C<sub>4</sub>-dicarboxylate/citrate sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: binding site and conversion of DcuS to a C<sub>4</sub>-dicarboxylate- or citrate-specific sensor.  
*J. Bacteriol* 189 (11), S. 4290–4298.
- Krämer, R.; Ziegler, C. (2009)  
Regulative interactions of the osmosensing C-terminal domain in the trimeric glycine betaine transporter BetP from *Corynebacterium glutamicum*.  
*Biol. Chem* 390 (8), S. 685–691.
- Krishnamurthy, H.; Piscitelli, C. L.; Gouaux, E. (2009)  
Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters.  
*Nature* 459, S. 347–355.
- Krogh, A.; Larsson, B.; Heijne, G. von; Sonnhammer, E. L. (2001)  
Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes.  
*J. Mol. Biol* 305 (3), S. 567–580.
- Kumari, S.; Simel, E. J.; Wolfe, A. J. (2000)  
sigma(70) is the principal sigma factor responsible for transcription of *acs*, which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol* 182 (2), S. 551–554.

- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. (2007)  
Clustal W and Clustal X version 2.0.  
*Bioinformatics* 23 (21), S. 2947–2948.
- Leinenweber, A.; Machtens, J.-P.; Begemann, B.; Fahlke, C. (2011)  
Regulation of glial glutamate transporters by C-terminal domains.  
*J. Biol. Chem* 286 (3), S. 1927–1937.
- Liu, F.; Culham, D. E.; Vernikovska, Y. I.; Keates, R. A.; Boggs, J. M.; Wood, J. M. (2007)  
Structure and function of transmembrane segment XII in osmosensor and osmoprotectant transporter ProP of *Escherichia coli*.  
*Biochemistry* 46 (19), S. 5647–5655.
- Lo, T. C.; Rayman, M. K.; Sanwal, B. D. (1972)  
Transport of succinate in *Escherichia coli*. I. Biochemical and genetic studies of transport in whole cells.  
*J. Biol. Chem* 247 (19), S. 6323–6331.
- Lo, T. C.; Sanwal, B. D. (1975)  
Genetic analysis of mutants of *Escherichia coli* defective in dicarboxylate transport.  
*Mol. Gen. Genet* 140 (4), S. 303–307.
- Lo, T. C.; Sanwal, B. D. (1975)  
Isolation of the soluble substrate recognition component of the dicarboxylate transport system of *Escherichia coli*.  
*J. Biol. Chem* 250 (4), S. 1600–1602.
- Lo, T. C.; Sanwal, B. D. (1975)  
Membrane bound substrate recognition components of the dicarboxylate transport system in *Escherichia coli*.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun* 63 (1), S. 278–285.
- Lolkema, J. S.; Slotboom, D. J. (2003)  
Classification of 29 families of secondary transport proteins into a single structural class using hydrophathy profile analysis.  
*J. Mol. Biol* 327 (5), S. 901–909.
- Loll, P. J. (2003)  
Membrane protein structural biology: the high throughput challenge.  
*J. Struct. Biol* 142 (1), S. 144–153.
- Manoil, C.; Boyd, D.; Beckwith, J. (1988)  
Molecular genetic analysis of membrane protein topology.  
*Trends Genet* 4 (8), S. 223–226.
- Mascher, T.; Helmann, J. D.; Uden, G. (2006)  
Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases.  
*Microbiol. Mol. Biol. Rev* 70 (4), S. 910–938.
- McGuffin, L. J.; Bryson, K.; Jones, D. T. (2000)  
The PSIPRED protein structure prediction server.  
*Bioinformatics* 16 (4), S. 404–405.
- Melo, F.; Feytmans, E. (1998)  
Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy.  
*J. Mol. Biol* 277 (5), S. 1141–1152.
- Michaelis, S.; Guarente, L.; Beckwith, J. (1983)  
In vitro construction and characterization of *phoA-lacZ* gene fusions in *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol* 154 (1), S. 356–365.
- Miller, J. (1992)  
A short course in bacterial genetics.  
*Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Miroux, B.; Walker, J. E. (1996)  
Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels.  
*J. Mol. Biol* 260 (3), S. 289–298.

- Mizuno, T. (1997)  
Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*.  
*DNA Res* 4 (2), S. 161–168.
- Monzel, C. (2011)  
Die periplasmatische Domäne der Sensor-Histidinkinase DcuS von *Escherichia coli*.  
*Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986)  
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.  
*Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 51 Pt 1, S. 263–273.
- Müller, M. (2007)  
Funktionskomplementierung des Fumaratsensors DcuS von *Escherichia coli* durch Hybriddimere.  
*Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Novick, R. P. (1987)  
Plasmid incompatibility.  
*Microbiol. Rev* 51 (4), S. 381–395.
- Nugent, T.; Jones, D. T. (2009)  
Transmembrane protein topology prediction using support vector machines.  
*BMC Bioinformatics* 10, S. 159.
- Oates, J.; Barrett, C. M.; Barnett, J. P.; Byrne, K. G.; Bolhuis, A.; Robinson, C. (2005)  
The *Escherichia coli* twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex.  
*J. Mol. Biol* 346 (1), S. 295–305.
- Perez, C.; Koshy, C.; Ressler, S.; Nicklisch, S.; Krämer, R.; Ziegler, C. (2011)  
Substrate specificity and ion coupling in the Na<sup>+</sup>/betaine symporter BetP.  
*EMBO J* 30 (7), S. 1221–1229.
- Peter, H.; Burkovski, A.; Krämer, R. (1998)  
Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*.  
*J. Biol. Chem* 273 (5), S. 2567–2574.
- Pos, K. M.; Dimroth, P.; Bott, M. (1998)  
The *Escherichia coli* citrate carrier CitT: a member of a novel eubacterial transporter family related to the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts.  
*J. Bacteriol* 180 (16), S. 4160–4165.
- Prakash, S.; Cooper, G.; Singhi, S.; Saier, M. H. (2003)  
The ion transporter superfamily.  
*Biochim. Biophys. Acta* 1618 (1), S. 79–92.
- Procaccini, A.; Lunt, B.; Szurmant, H.; Hwa, T.; Weigt, M. (2011)  
Dissecting the specificity of protein-protein interaction in bacterial two-component signaling: orphans and crosstalks.  
*PLoS ONE* 6 (5), S. e19729.
- Punta, M.; Forrest, L. R.; Bigelow, H.; Kernysky, A.; Liu, J.; Rost, B. (2007)  
Membrane protein prediction methods.  
*Methods* 41 (4), S. 460–474.
- Rabin, R. S.; Stewart, V. (1993)  
Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12.  
*J. Bacteriol* 175 (11), S. 3259–3268.
- Rapp, M.; Drew, D.; Daley, D. O.; Nilsson, J.; Carvalho, T.; Melén, K.; Gier, J.-W. de; Heijne, G. von (2004)  
Experimentally based topology models for *E. coli* inner membrane proteins.  
*Protein Sci* 13 (4), S. 937–945.

- Raunser, S.; Appel, M.; Ganea, C.; Geldmacher-Kaufer, U.; Fendler, K.; Kühlbrandt, W. (2006)  
Structure and function of prokaryotic glutamate transporters from *Escherichia coli* and *Pyrococcus horikoshii*.  
*Biochemistry* 45 (42), S. 12796–12805.
- Reid, C. J.; 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), S. 2660–2669.
- Ressl, S.; van Terwisscha Scheltinga, A. C.; Vonnrhein, C.; Ott, V.; Ziegler, C. (2009)  
Molecular basis of transport and regulation in the Na(+)/betaine symporter BetP.  
*Nature* 458 (7234), S. 47–52.
- Reyes, N.; Ginter, C.; Boudker, O. (2009)  
Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters.  
*Nature* 462 (7275), S. 880–885.
- Robinson, J. B.; Bauer, W. D. (1993)  
Relationships between C<sub>4</sub> dicarboxylic acid transport and chemotaxis in *Rhizobium meliloti*.  
*J. Bacteriol* 175 (8), S. 2284–2291.
- Rosenberg, H.; Cox, G. B.; Butlin, J. D.; Gutowski, S. J. (1975)  
Metabolite transport in mutants of *Escherichia coli* K12 defective in electron transport and coupled phosphorylation.  
*Biochem. J* 146 (2), S. 417–423.
- Russ, W. P.; Engelman, D. M. (2000)  
The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association.  
*J. Mol. Biol* 296 (3), S. 911–919.
- Sambrook, J.; Russel, D. (2001)  
Molecular cloning: A Laboratory Manual (Third Edition), Volume 3.  
*Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Scheu, P. D. (2005)  
Der Fumaratsensor DcuS von *Escherichia coli*.  
*Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Scheu, P. D.; Witan, J.; Rauschmeier, M.; Graf, S.; Liao, Y.-F.; Ebert-Jung, A.; Basché, T.; Erker, W.; Unden, G. (2012)  
CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system *in vivo*.  
*J. Bacteriol* 194 (3), S. 636–645.
- Scheu, P. D.; Kim, O. B.; Griesinger, C.; Unden, G. (2010)  
Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: exogenous versus endogenous sensing of C(4)-dicarboxylates in bacteria.  
*Future Microbiol* 5 (9), S. 1383–1402.
- Scheu, P. D.; Liao, Y.-F.; Bauer, J.; Kneuper, H.; Basché, T.; Unden, G.; Erker, W. (2010)  
Oligomeric sensor kinase DcuS in the membrane of *Escherichia coli* and in proteoliposomes: chemical cross-linking and FRET spectroscopy.  
*J. Bacteriol* 192 (13), S. 3474–3483.
- Scheu, P.; Sdorra, S.; Liao, Y.-F.; Wegner, M.; Basché, T.; Unden, G.; Erker, W. (2008)  
Polar accumulation of the metabolic sensory histidine kinases DcuS and CitA in *Escherichia coli*.  
*Microbiology (Reading, Engl.)* 154 (Pt 8), S. 2463–2472.
- Schwöppe, C.; Winkler, H. H.; Neuhaus, H. E. (2003)  
Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in *Escherichia coli*.  
*Eur. J. Biochem* 270 (7), S. 1450–1457.
- Seidel, T. (2010)  
Expression und Funktion des *yfcC* Gens und Genprodukts in *Escherichia coli*.  
*Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.

- Shaw, D. J.; Guest, J. R. (1982)  
Amplification and product identification of the *fnr* gene of *Escherichia coli*.  
*J. Gen. Microbiol* 128 (10), S. 2221–2228.
- Six, S.; Andrews, S. C.; Unden, G.; Guest, J. R. (1994)  
*Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct).  
*J. Bacteriol* 176 (21), S. 6470–6478.
- Slotboom, D. J.; Konings, W. N.; Lolkema, J. S. (1999)  
Structural features of the glutamate transporter family.  
*Microbiol. Mol. Biol. Rev* 63 (2), S. 293–307.
- Slotboom, D. J.; Konings, W. N.; Lolkema, J. S. (2001)  
The structure of glutamate transporters shows channel-like features.  
*FEBS Lett* 492 (3), S. 183–186.
- Slotboom, D. J.; Lolkema, J. S.; Konings, W. N. (1996)  
Membrane topology of the C-terminal half of the neuronal, glial, and bacterial glutamate transporter family.  
*J. Biol. Chem* 271 (49), S. 31317–31321.
- Spiro, S.; Guest, J. R. (1990)  
FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*.  
*FEMS Microbiol. Rev* 6 (4), S. 399–428.
- Stewart, V. (1993)  
Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*.  
*Mol. Microbiol* 9 (3), S. 425–434.
- Stock, A. M.; Robinson, V. L.; Goudreau, P. N. (2000)  
Two-component signal transduction.  
*Annu. Rev. Biochem* 69, S. 183–215.
- Studier, F. W.; Moffatt, B. A. (1986)  
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.  
*J. Mol. Biol* 189 (1), S. 113–130.
- Szvetnik, A.; Gál, J.; Kálmán, M. (2007)  
Membrane topology of the GltS Na<sup>+</sup>/glutamate permease of *Escherichia coli*.  
*FEMS Microbiol. Lett* 275 (1), S. 71–79.
- Taylor, B. L.; Zhulin, I. B. (1999)  
PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light.  
*Microbiol. Mol. Biol. Rev* 63 (2), S. 479–506.
- Tetsch, L.; Jung, K. (2009)  
The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria.  
*Mol. Microbiol* 73 (6), S. 982–991.
- Tetsch, L.; Koller, C.; Haneburger, I.; Jung, K. (2008)  
The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP.  
*Mol. Microbiol* 67 (3), S. 570–583.
- Tøndervik, A.; Strøm, A. R. (2007)  
Membrane topology and mutational analysis of the osmotically activated BetT choline transporter of *Escherichia coli*.  
*Microbiology (Reading, Engl.)* 153 (Pt 3), S. 803–813.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979)  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 76 (9), S. 4350–4354.
- Trainer, M. A.; Yurgel, S. N.; Kahn, M. L. (2007)  
Role of a conserved membrane glycine residue in a dicarboxylate transporter from *Sinorhizobium meliloti*.  
*J. Bacteriol* 189 (5), S. 2160–2163.

- Trautwein, K.; Grundmann, O.; Wöhlbrand, L.; Eberlein, C.; Boll, M.; Rabus, R. (2012)  
Benzoate mediates repression of C(4)-dicarboxylate utilization in "*Aromatoleum aromaticum*" EbN1.  
*J. Bacteriol* 194 (2), S. 518–528.
- Ullmann, R.; Gross, R.; Simon, J.; Unden, G.; Kröger, A. (2000)  
Transport of C(4)-dicarboxylates in *Wolinella succinogenes*.  
*J. Bacteriol* 182 (20), S. 5757–5764.
- Unden, G.; Kleefeld, A. (2004)  
C<sub>4</sub>-dicarboxylate degradation in aerobic and anaerobic growth.  
<http://www.ecosal.org>.
- Unden, G.; Trageser, M. (1991)  
Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: control of anaerobic respiration by the FNR protein.  
*Antonie Van Leeuwenhoek* 59 (2), S. 65–76.
- Valentini, M.; Storelli, N.; Lapouge, K. (2011)  
Identification of C(4)-dicarboxylate transport systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.  
*J. Bacteriol* 193 (17), S. 4307–4316.
- Wagner, C.; Odom, R.; Briggs, W. T. (1972)  
The uptake of acetate by *Escherichia coli* w.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun* 47 (5), S. 1036–1043.
- Waldo, G. S.; Standish, B. M.; Berendzen, J.; Terwilliger, T. C. (1999)  
Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein.  
*Nat. Biotechnol* 17 (7), S. 691–695.
- Wallace, B. J.; Young, I. G. (1977)  
Aerobic respiration in mutants of *Escherichia coli* accumulating quinone analogues of ubiquinone.  
*Biochim. Biophys. Acta* 461 (1), S. 75–83.
- West, A. H.; Stock, A. M. (2001)  
Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems.  
*Trends Biochem. Sci* 26 (6), S. 369–376.
- Wolfe, A. J. (2005)  
The acetate switch.  
*Microbiol. Mol. Biol. Rev* 69 (1), S. 12–50.
- Witan, J. (2008)  
Expression und Funktion der Dcu-Carrier und des Dcu-homologen Proteins YfcC aus *Escherichia coli*.  
*Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Witan, J.; Bauer, J.; Steinmetz, P.; Erker, W.; Unden, G. (2012)  
Functional interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS  
(Manuskript eingereicht)
- Yamamoto, K.; Hirao, K.; Oshima, T.; Aiba, H.; Utsumi, R.; Ishihama, A. (2005)  
Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*.  
*J. Biol. Chem* 280 (2), S. 1448–1456.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985)  
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.  
*Gene* 33 (1), S. 103–119.
- Yernool, D.; Boudker, O.; Folta-Stogniew, E.; Gouaux, E. (2003)  
Trimeric subunit stoichiometry of the glutamate transporters from *Bacillus caldotenax* and *Bacillus stearothermophilus*.  
*Biochemistry* 42 (44), S. 12981–12988.
- Yernool, D.; Boudker, O.; Jin, Y.; Gouaux, E. (2004)  
Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*.  
*Nature* 431 (7010), S. 811–818.



- Youn, J.-W.; Jolkver, E.; Krämer, R.; Marin, K.; Wendisch, V. F. (2008)  
Identification and characterization of the dicarboxylate uptake system DccT in *Corynebacterium glutamicum*.  
*J. Bacteriol* 190 (19), S. 6458–6466.
- Youn, J.-W.; Jolkver, E.; Krämer, R.; Marin, K.; Wendisch, V. F. (2009)  
Characterization of the dicarboxylate transporter DctA in *Corynebacterium glutamicum*.  
*J. Bacteriol* 191 (17), S. 5480–5488.
- Yurgel, S.; Mortimer, M. W.; Rogers, K. N.; Kahn, M. L. (2000)  
New substrates for the dicarboxylate transport system of *Sinorhizobium meliloti*.  
*J. Bacteriol* 182 (15), S. 4216–4221.
- Yurgel, S. N.; Kahn, M. L. (2004)  
Dicarboxylate transport by rhizobia.  
*FEMS Microbiol. Rev* 28 (4), S. 489–501.
- Yurgel, S. N.; Kahn, M. L. (2005)  
*Sinorhizobium meliloti* *dctA* mutants with partial ability to transport dicarboxylic acids.  
*J. Bacteriol* 187 (3), S. 1161–1172.
- Zheng, D.; Constantinidou, C.; Hobman, J. L.; Minchin, S. D. (2004)  
Identification of the CRP regulon using *in vitro* and *in vivo* transcriptional profiling.  
*Nucleic Acids Res* 32 (19), S. 5874–5893.
- Zhou, Y.-F.; Nan, B.; Nan, J.; Ma, Q.; Panjikar, S.; Liang, Y.-H.; Wang, Y.; Su, X.-D. (2008)  
C<sub>4</sub>-dicarboxylates sensing mechanism revealed by the crystal structures of DctB sensor domain.  
*J. Mol. Biol* 383 (1), S. 49–61.
- Zientz, E.; Bongaerts, J.; Uden, G. (1998)  
Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR* genes) two-component regulatory system.  
*J. Bacteriol* 180 (20), S. 5421–5425.
- Zientz, E.; Janausch, I. G.; Six, S.; Uden, G. (1999)  
Functioning of DcuC as the C<sub>4</sub>-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol* 181 (12), S. 3716–3720.
- Zientz, E.; Six, S.; Uden, G. (1996)  
Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange.  
*J. Bacteriol* 178 (24), S. 7241–7247.

## 7 Anhang

Anhang zu Kap. 3.1:

Tab. 19: Liste der verwendeten Chemikalien.

Substanz	Hersteller	Art. Nr.
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	Serva	12548
1-[ <sup>14</sup> C]-Acetat	Hartmann Analytic	-
2,3-[ <sup>14</sup> C]-Acetat	Hartmann Analytic	-
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Fluka	43819
2-Mercaptoethanol	Roth	4227.1
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth	6979.2
4-Chlor-1-naphthol	Sigma-Aldrich	C8890
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich	B4252
Acrylamid-Mix	Roth	3029.1
Agar-Agar, Kobe 1	Roth	5210.2
Ammoniumchlorid	Fluka	09718
Ampicillin Natriumsalz	Roth	K029.1
Anhydrotetracyclin	IBA	2-0401
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	A3678
Bacto-Trypton	Becton, Dickson and Company	211708
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	Roth	8072.2
Bromphenolblau	Janssen Chimica	15.134.02
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth	6781.1
Casein, Säurehydrolysat	Gibco	30392-021
Chloramphenicol	Fluka	23275
Chloroform	Roth	3313.2
Coomassie brilliant blue	Serva	17525
D-Glukose x 1 H <sub>2</sub> O (Monohydrat)	Roth	6887.1
D-Maltose	Fluka	63420
D-Saccharose	Roth	4621.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka	41640
Dinatriumfumarat	Roth	47970
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth	4984.2
Dinatriumoxalat	Sigma	O-0501
Dinatriumsuccinat	Roth	3195.1
Disuccinimidyl Suberat (DSS)	Sigma	S1885
dNTP Mix	Fermentas	R0193
Eisessig	Riedel de Haen	27222
Ethanol	Merck	107017
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth	8043.2
Glycerin	Roth	4043.3
Glycin	Roth	3908.3
Hefeextrakt	Serva (Servabacter)	24540
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore	P90718

Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Fermentas	R0392
Kaliumchlorid (KCl)	Roth	6781.1
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth	3904.1
Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Fluka	6878.1
Kanamycinsulfat	Roth	
Laktat, Natriumsalz	Serva	29763
L-Arabinose	Merck	178680
L-Tryptophan	Serva	37422
Lithiumchlorid	Roth	3739.1
Magermilchpulver	Fluka	70166
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	Fluka	63535
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Roth	T8222.2
Malat, Dinatriumsalz	Sigma	M9138
Methanol	Roth	P717.1
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka	87689
Natriumacetat	Roth	6773.2
Natriumbutyrat	Merck	567430
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Fluka	71351
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	9265.2
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	CN30.2
o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG)	Fluka	73660
Pepton aus Casein	Roth	8952.3
p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP)	Fluka	71768
Polyethylenglykol 6000 (PEG 6000)	Roth	0158.4
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Roth	9127.1
Ponceau S	Roth	5938.2
Propionat	Fluka	81992
Rotisol (Ethanol vergällt)	Merck	1.00974
Spectinomycin	Sigma	S-9007
Tetracyclin	Fluka	87130
Trichloressigsäure	Roth	8789.1
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth	5429.3
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30 %	Fluka	8070.4
Zinkchlorid	Roth	3533.1

---

Anhang zu Kap. 4.1.4:

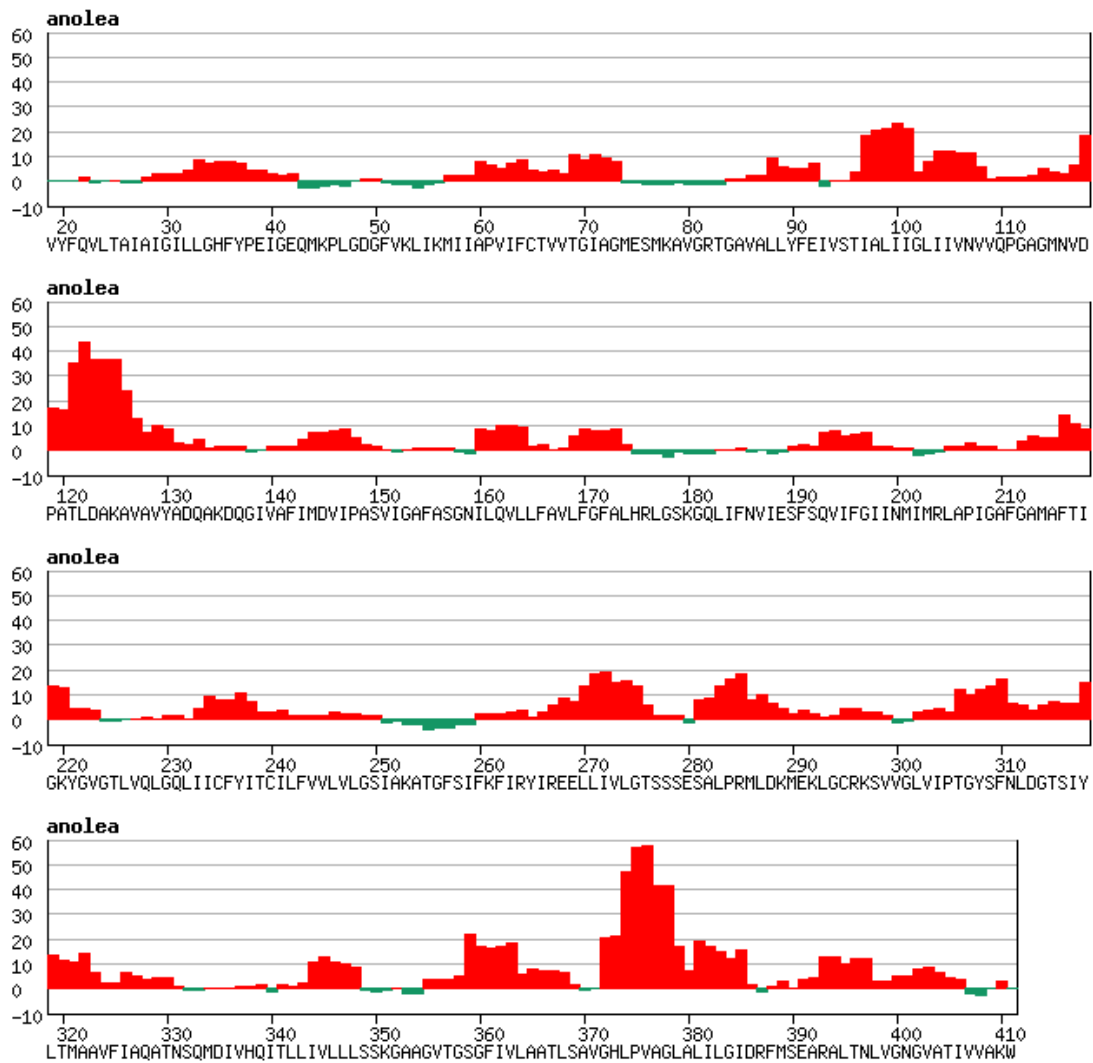


Abb. A1: **Qualitätsberechnung der DctA 3D-Strukturvorhersage mit Glt<sub>Ph</sub> (2NWX) als Vorlage durch anolea (Melo et al., 1998).** Je größer der Wert, desto schlechter ist das Strukturmodell von DctA<sub>Ec</sub> auf Basis von Glt<sub>Ph</sub> an der entsprechenden Aminosäureposition.

Anhang zu Kap. 4.2.1:

Untersuchung der Regulation in  $DctA^-$  bzw.  $DcuB^-$  Deletionsstämmen mit plasmidkodiertem  $DcuB$ .

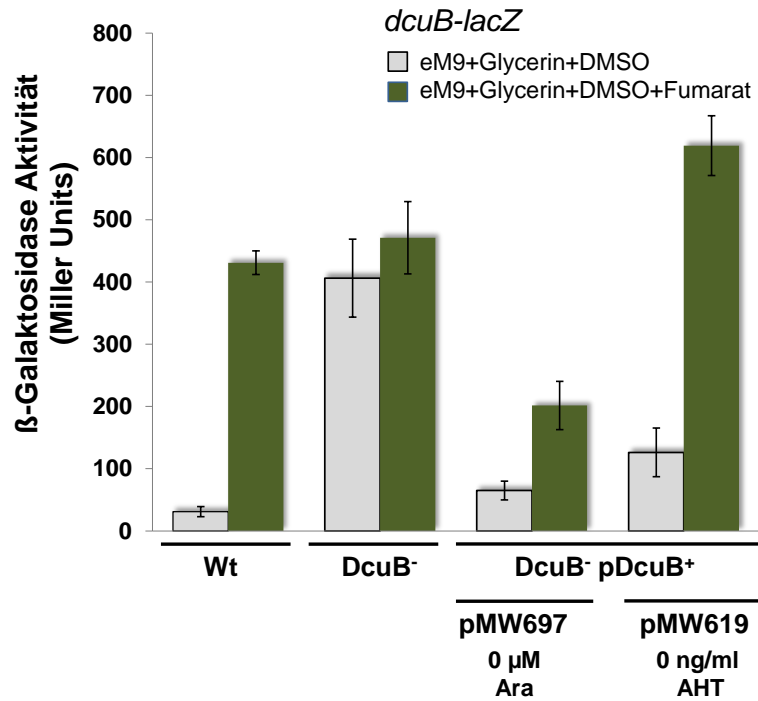


Abb. A2: **Genexpression von  $dcuB-lacZ$  in einem  $DcuB$ -negativen Stamm und Komplementation durch plasmidkodiertes  $DcuB$  ( $pDcuB^+$ ).** Messung erfolgte nach anaerober Zucht in eM9 mit Glycerin und DMSO mit (grün) oder ohne (grau) Fumarat mit dem Wildtyp (Wt, IMW237) und einer  $DcuB$ -negativen Mutante ( $DcuB^-$ , IMW505). Die Komplementation durch zwei plasmidkodierte  $DcuB$  Plasmide (pMW697, pMW619) erfolgte ohne zusätzliche Induktion.

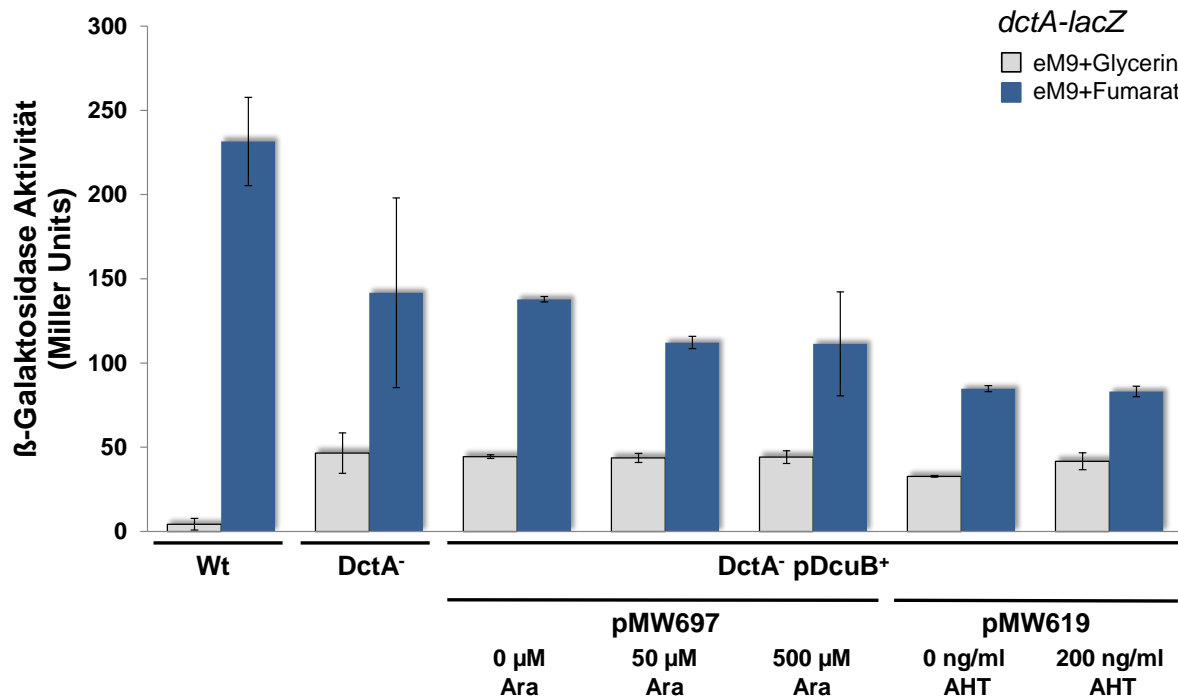


Abb. A3: Genexpression von *dctA-lacZ* in einem DctA-negativen Stamm und Komplementation durch plasmidkodiertes DcuB (pDcuB<sup>+</sup>). Gemessen wurde nach aerober Zucht in eM9 plus Fumarat (dunkelblau) oder Glycerin (grau) mit dem Wildtyp (Wt, IMW385) und der DctA-negativen Mutante (DctA<sup>-</sup>, IMW386). Plasmidkodiertes DcuB (pDcuB<sup>+</sup>) wurde mit verschiedenen Vektoren (pMW697, pMW619) und Induktoren (Ara = L-Arabinose, AHT = Anhydrotetracyclin) exprimiert um die DctA-Deletion zu komplementieren.

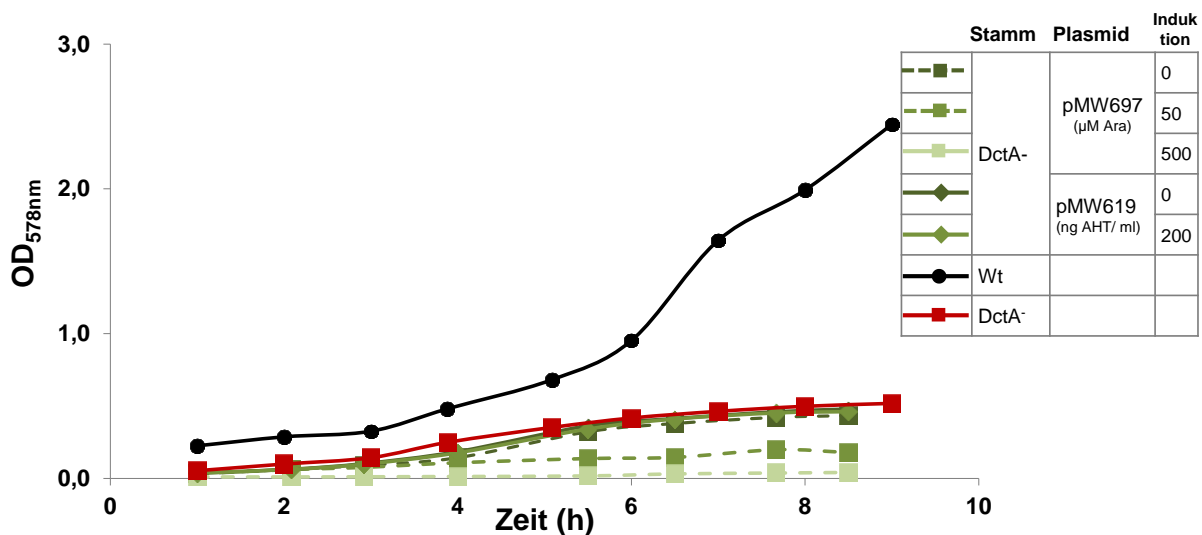


Abb. A4: Wachstumskomplementation eines DctA-negativen Stamms (DctA<sup>-</sup>, IMW386) durch plasmidkodiertes DcuB (pMW619, pMW697). Die Zucht erfolgte aerob in eM9 + 50 mM Fumarat. Als Positivkontrolle diente der Wildtypstamm AN387. Der unkomplementierte Stamm IMW386 diente als Negativkontrolle.

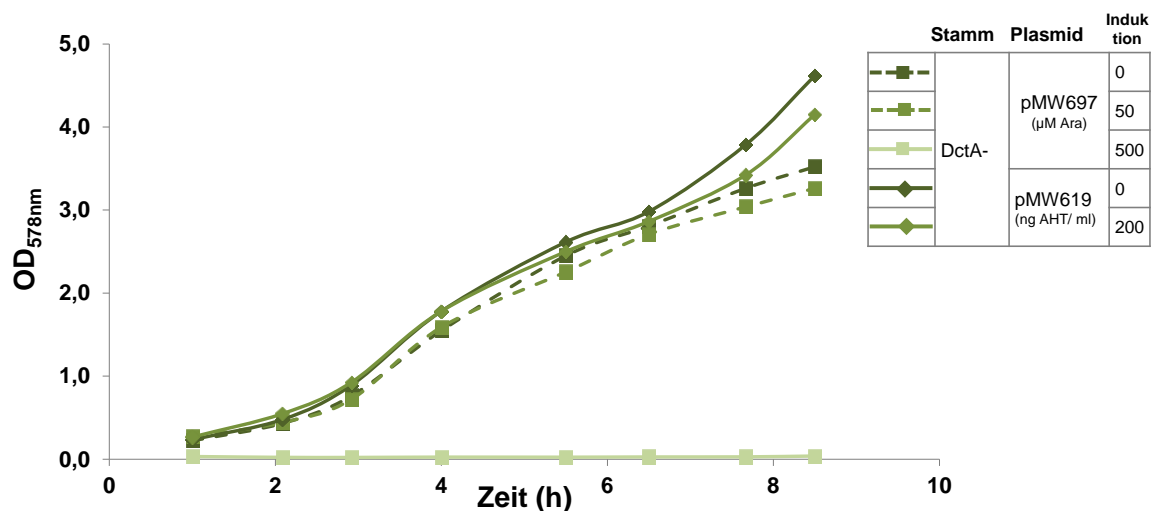


Abb. A5: Wachstumskontrolle eines DctA-negativen Stamms (DctA<sup>-</sup>, IMW386) mit plasmid-kodiertem DcuB (pMW619, pMW697). Die Zucht erfolgte aerob in eM9 + 50 mM Glycerin, DctA wird unter diesen Bedingungen nicht benötigt.

Anhang zu Kap. 4.5.2:

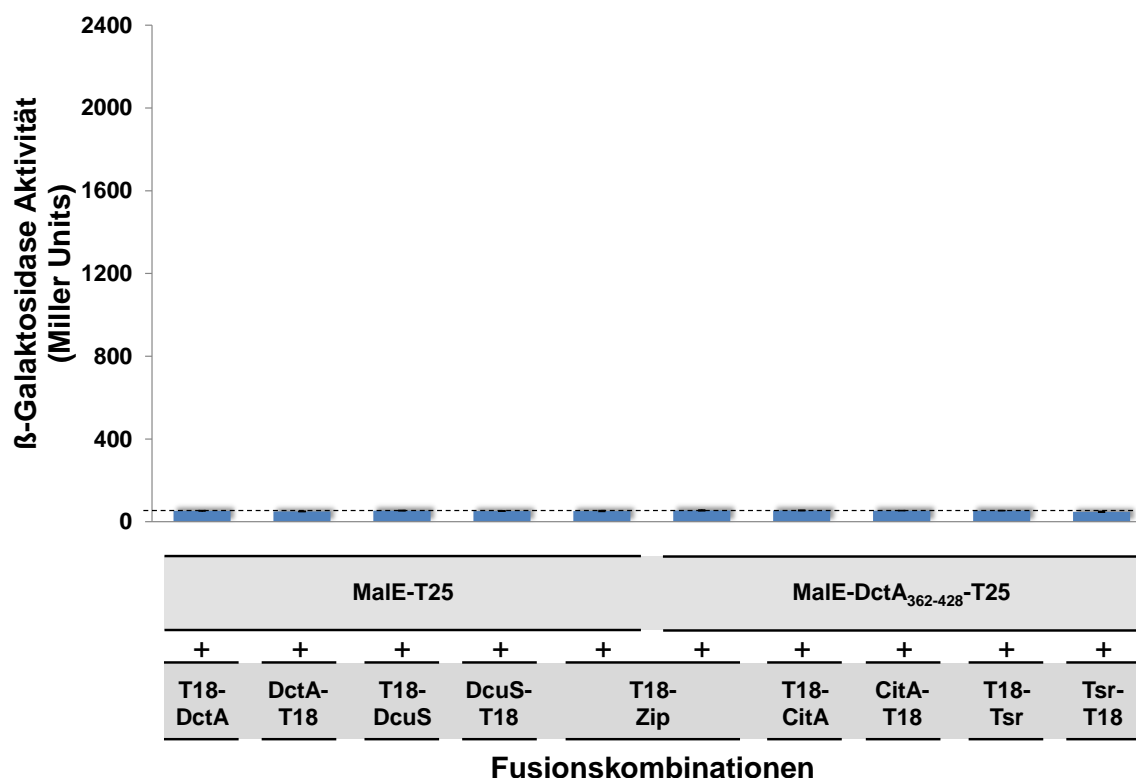


Abb. A6: **Kontrollen für die Interaktion von MalE-fusionierten Konstrukten mit verschiedenen Proteinen.** N-terminal verkürztes DctA-T25 mit N-terminaler MalE-Fusion (MalE-DctA<sub>362-428</sub>-T25, pMW1647) oder die MalE-T25-Fusion alleine (pMW1645) wurde mit N- oder C-terminal fusioniertem DctA (T18-DctA, pMW917; DctA-T18, pMW918), DcuS (T18-DcuS, pMW429; DcuS-T18, pMW428), CitA (T18-CitA, pMW1025; CitA-T18, pMW1026), Tsr (T18-Tsr, pMW1445; Tsr-T18, pMW1446) oder N-terminal fusioniertem Leucin Zipper T18-Zip kombiniert.

Anhang zu Kap. 4.8.3:

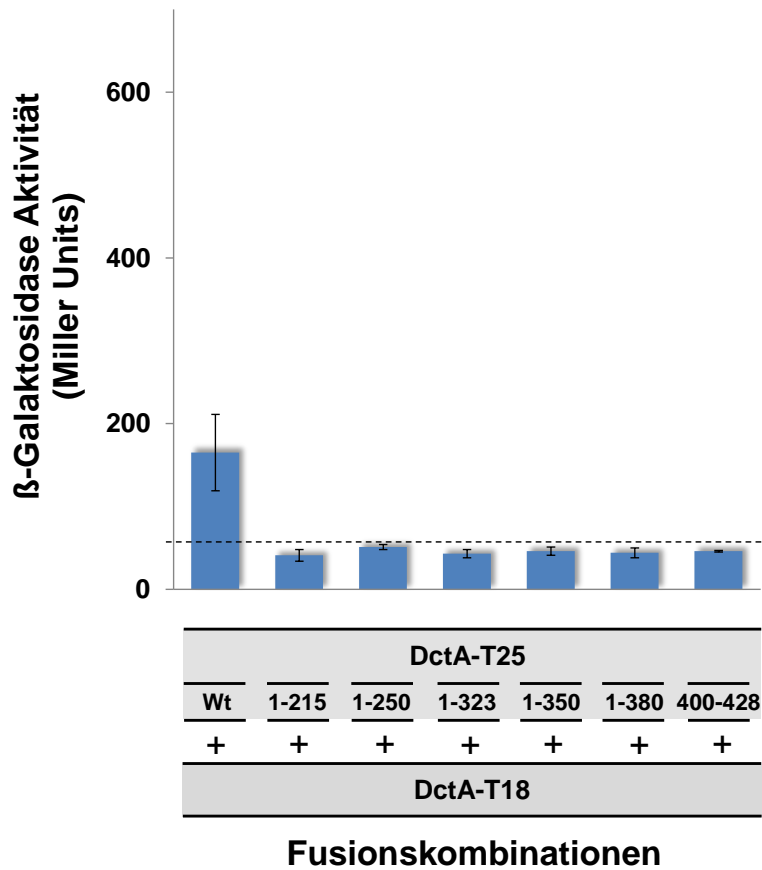


Abb. A7: **Interaktion von C-terminal verkürztem DctA-T25 mit wildtypischen DctA-T18.** DctA wurde C-terminal verkürzt, mit T25 fusioniert und mit DctA-T18 (pMW918) kombiniert. DctA-Plasmide: DctA<sub>1-215</sub>-T25 (pMW931), DctA<sub>1-250</sub>-T25 (pMW932), DctA<sub>1-323</sub>-T25 (pMW933), DctA<sub>1-350</sub>-T25 (pMW934), DctA<sub>1-380</sub>-T25 (pMW935), DctA<sub>400-428</sub>-T25 (pMW1126).



Anhang zu Kap. 4.10.2:

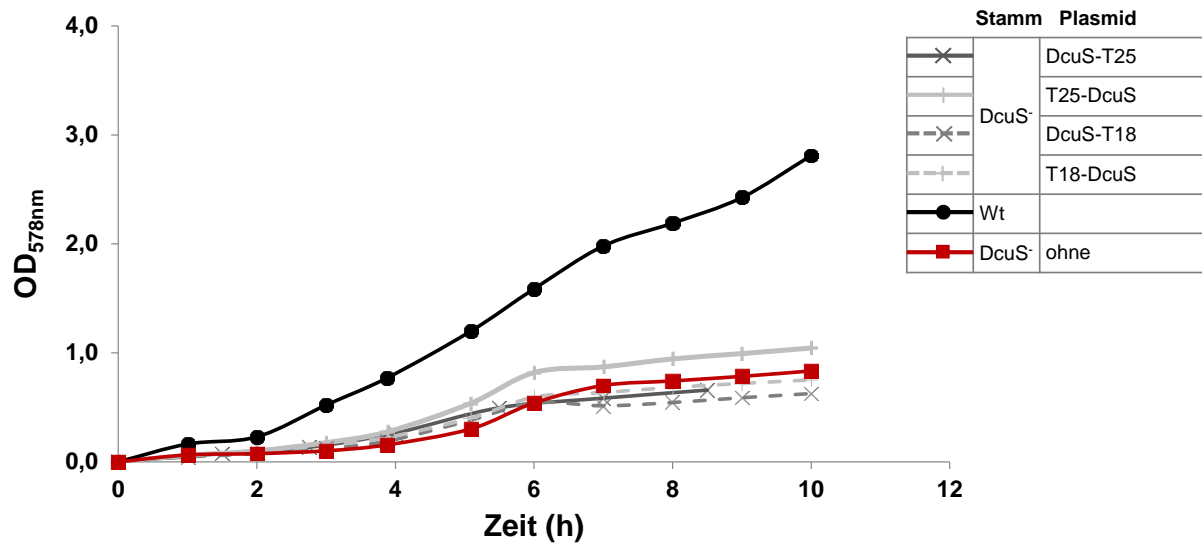


Abb. A8: Wachstumskomplementation eines DcuS-negativen Stamms (DcuS<sup>-</sup>, IMW260) durch wildtypische DcuS-Fusionsproteine des BACTH-Systems. Es wurden DcuS-T25 (pMW919), T25-DcuS (pMW426), DcuS-T18 (pMW428) und T18-DcuS (pMW429) exprimiert. Die Zucht erfolgte aerob in eM9 + 50 mM Fumarat. Als Positivkontrolle diente der Wildtypstamm AN387. Die unkomplementierte Mutante IMW260 diente als Negativkontrolle.

Anhang zu Kap. 4.11:

Tab. A1: **Quantitative Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinpaaren.** Von den zu untersuchenden Proteinpaaren enthält jeweils eines ein an den N- oder C-Terminus fusioniertes T25-Fragment und das andere ein T18-Fragment. Die quantitative Bestimmung erfolgte wie in Material und Methode beschrieben. Grau hinterlegt ist die DcuS/DcuS Homodimerisierung. DcuB/DcuS Wechselwirkungen sind mit einem grünen und DctA/DctA sowie DctA/DcuS-Interaktionen mit einem blauen Hintergrund gefärbt.

	DcuS-T18	T18-DcuS	DctA-T18	T18-DctA	Tsr-T18	T18-Tsr	CitA-T18	T18-CitA	T18-Zip
DcuS-T25	31 ±2	546 ±174	564 ±87	59 ±14	-	-	295 ±55	97 ±50	49 ±1
T25-DcuS	480 ±518	1872 ±117	550 ±203	595 ±174	-	589 ±105	257 ±59	154 ±72	49 ±14
DctA-T25	431 ±182	58 ±22	165 ±46	131 ±95	327 ±148	-	103 ±17	47 ±0	24 ±5
T25-DctA	375 ±145	761 ±245	395 ±85	604 ±147	-	309 ±115	295 ±56	67 ±11	<55
Tsr-T25	739 ±719	-	-	-	-	265 ±128	491 ±478	-	<55
T25-Tsr	-	-	-	-	-	2142 ±156	-	-	<55
T25-DcuR	374 ±347	1153 ±51	46 ±3	28 ±7	-	-	49 ±2	48 ±2	52 ±3
CitB-T25	-	51 ±7	46 ±1	-	53 ±3	-	-	123 ±41	<55
DcuB-SW	298 ±59	653 ±153	338 ±52	287 ±49	344 ±255	-	-	-	<55
T25-Zip	53 ±1	24 ±5	47 ±1	50 ±1	<55	<55	<55	<55	1254 ±84

## Anhang zu Kap. 4.12.1:

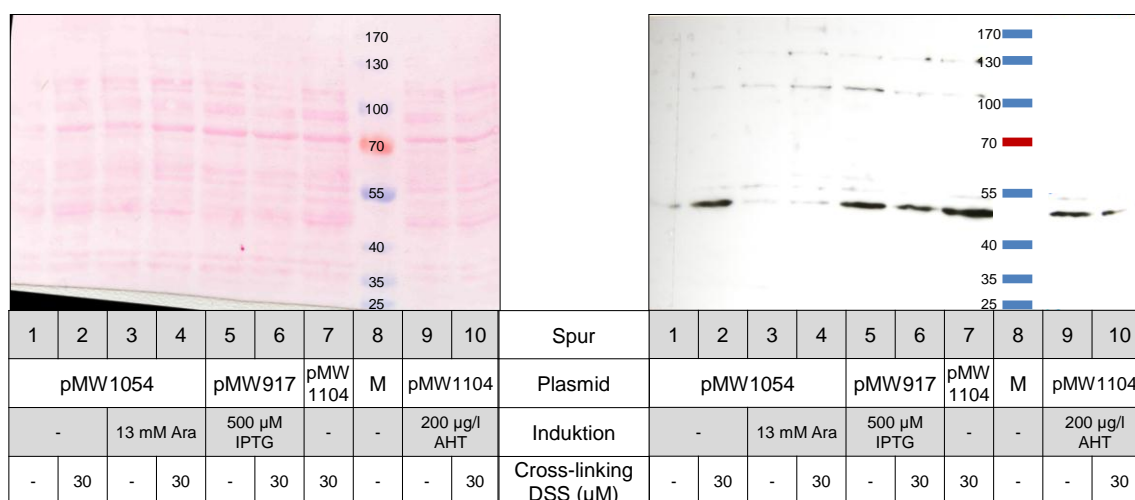


Abb. A9: **Expression verschiedener DctA-Plasmide zum Test eines DctA-Antikörpers auf Spezifität.** Linke Seite: Proteinfärbung eines Western Blots von 50 µg Gesamtprotein pro Spur mit Ponceau-Rot. Rechte Seite: Antikörperfärbung mit anti-DctA Antikörper. DctA kodierende Plasmide wurden dem Schema entsprechend für drei Stunden exprimiert. Bei den Proteinen handelt es sich um: DctA1-380-PhoA (pMW1054), T18-DctA (pMW917), DctA-Strep (pMW1104). Die nachgewiesene Bande ist unabhängig von der Expression oder der voraussichtlichen DctA-Proteingröße auf einer Höhe und somit unspezifisch. M = Marker SM0671, Ara = L-Arabinose, IPTG = Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid.

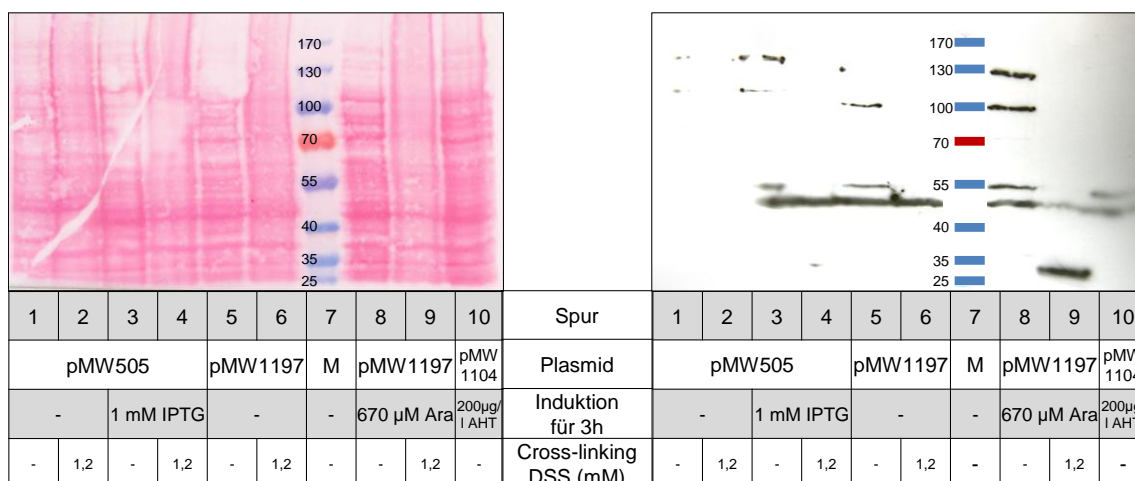


Abb. A10: **Expression verschiedener DctA-Plasmide zum Test eines DctA-Antikörpers auf Spezifität.** Linke Seite: Proteinfärbung eines Western Blots von 100 µg Gesamtprotein pro Spur mit Ponceau-Rot. Rechte Seite: Antikörperfärbung mit anti-DctA Antikörper. DctA kodierende Plasmide wurden dem Schema entsprechend für drei Stunden exprimiert. Bei den Proteinen handelt es sich um: DctA-His (pMW505), DctA-His<sub>C→S</sub> (pMW1197). Die nachgewiesene Bande ist unabhängig von der Expression oder der voraussichtlichen DctA-Proteingröße auf einer Höhe und somit unspezifisch. M = Marker SM0671, Ara = L-Arabinose, IPTG = Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid, AHT = Anhydrotetracyclin.

Anhang zu Kap. 4.12.4:

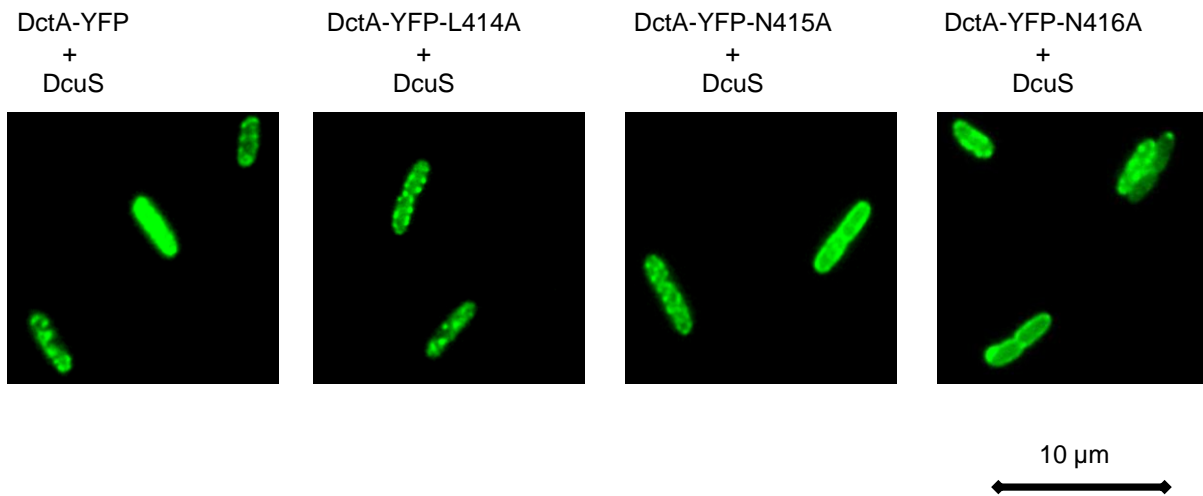


Abb. A11: Lokalisation von DctA-YFP (pMW526) und den Varianten L414A (pMW1338), N415A (pMW1339) und N416A (pMW1340) nach Co-Expression mit His-DcuS (pMW1390). Für die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie wurden die DctA-Plasmide im *E. coli* Stamm MC4100 mit His-DcuS co-exprimiert und durch 670 μM L-Arabinose exprimiert. Nach Wachstum bis zu einer  $OD_{578nm} = 0,5-0,7$  bei 30°C wurde die Fluoreszenz gemessen.

Anhang zu Kap. 4.14.2:

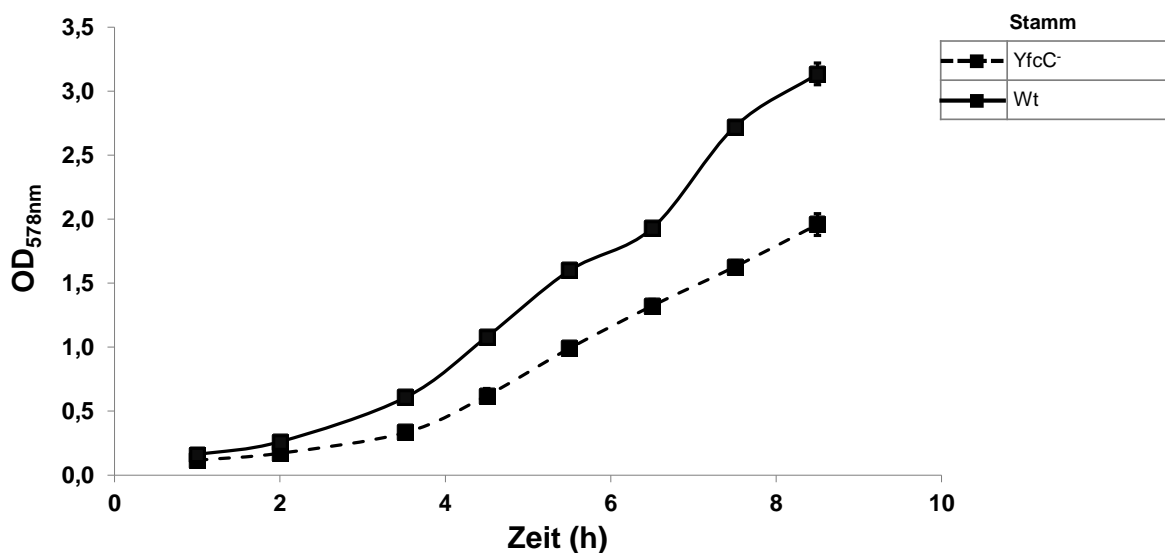


Abb. A12: Aerobes Wachstum von YfcC-Mutanten auf 50 mM Succinat. Das Wachstum der YfcC<sup>-</sup> Einzelmutante der Keio Collection Keio YfcC<sup>-</sup> (JW2295) wurde mit dem entsprechenden Wildtypstamm Keio Wt (BW25113) verglichen.

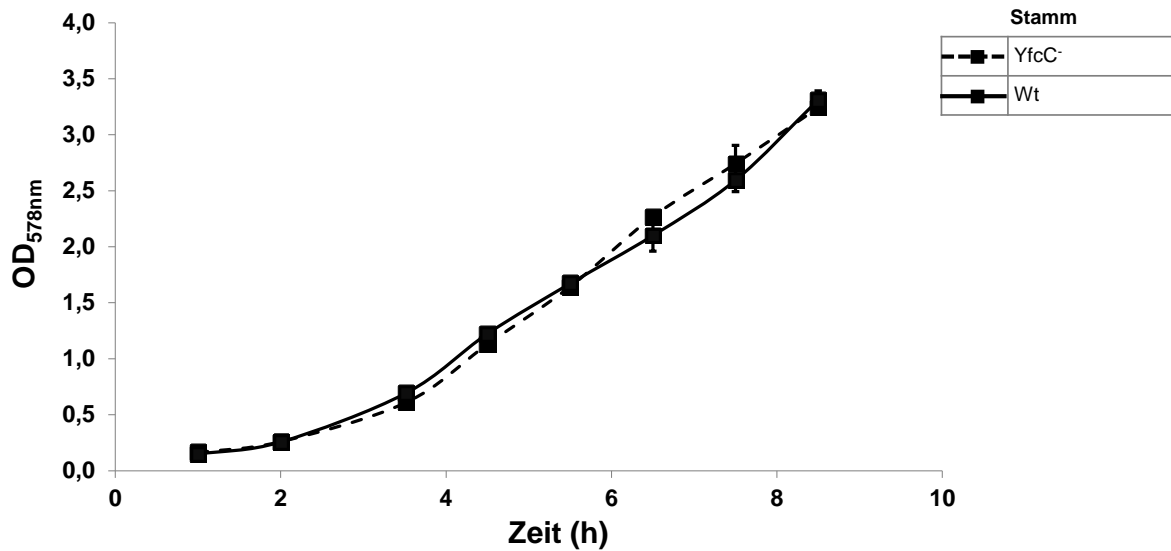


Abb. A13: **Aerobes Wachstum von YfcC-Mutanten auf 50 mM Glycerin.** Das Wachstum der YfcC<sup>-</sup> Einzelmutante der Keio Collection Keio YfcC<sup>-</sup> (JW2295) wurde mit dem entsprechenden Wildtypstamm Keio Wt (BW25113) verglichen.

Tab. A2: **Gegenüberstellung des Genotyps der Keio Collection Stämme mit den Stämmen der AG Wolfe.**

Stamm	Keio Wildtyp (BW25113)	Wolfe Wildtyp (AJW678)
F Plasmid	-	-
Chromosomale Marker	$\Delta(araD-araB)567$	<i>thr-1</i>
	$\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$	<i>leuB6</i> (Am)
	$\lambda$	$\Delta(codB-lacI)3$
	<i>rph-1</i>	<i>rpsL136</i> (strR)
	$\Delta(rhaD-rhaB)568$	<i>metF159</i> (Am)
	<i>hsdR514</i>	<i>thi-1</i>

Anhang zu Kap. 4.15.1:

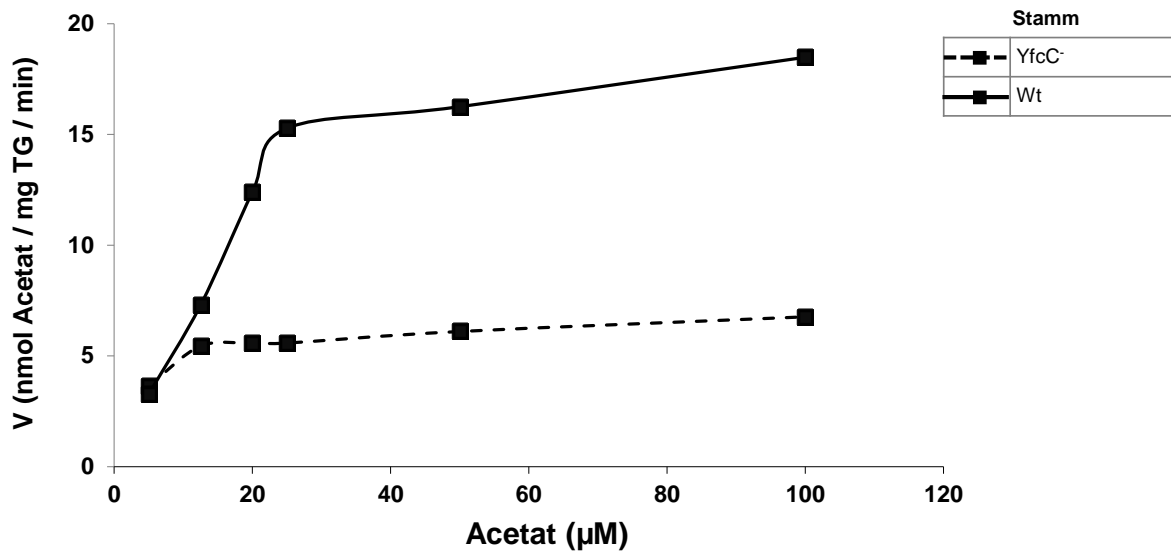


Abb. A14: **Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme von  $[^{14}\text{C}]$ -Acetat durch den Wildtyp (Wt, BW25113) und die Mutante YfcC (JW2295).** Die Kulturen wurden aerob in eM9 mit 50 mM Acetat bis zu einer  $\text{OD}_{578\text{nm}}$  von 0,5-0,7 gezüchtet. Die Inkubationszeit betrug 2 min.

Anhang zu Kap. 4.15.2:

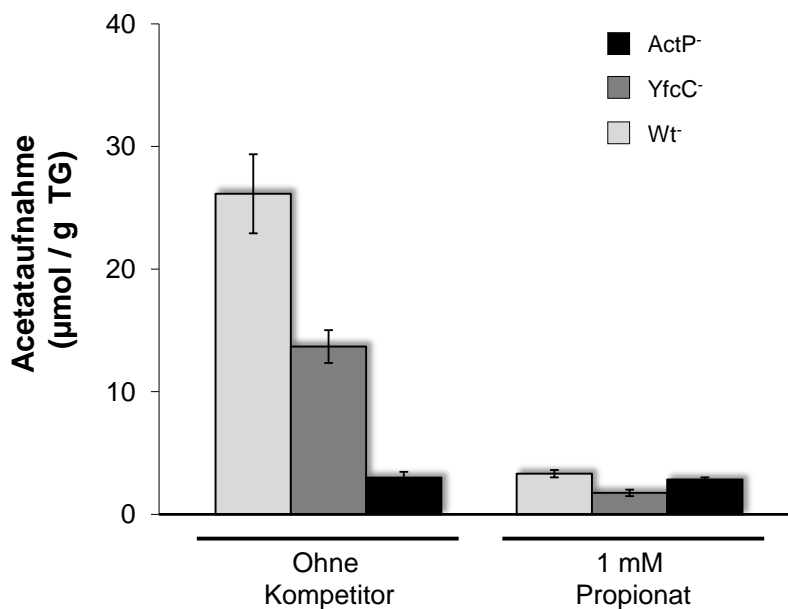


Abb. A15: **Konkpetition der  $[^{14}\text{C}]$ -Acetataufnahme von verschiedenen Mutanten durch Propionat.** Die Inkubation in 20  $\mu\text{M}$   $[^{14}\text{C}]$ -Acetat wurde nach 2 min gestoppt. Als Kompetitor wurde Propionat in 50-fachem Überschuss eingesetzt (1 mM).

## Anhang zu Kap. 5.1:

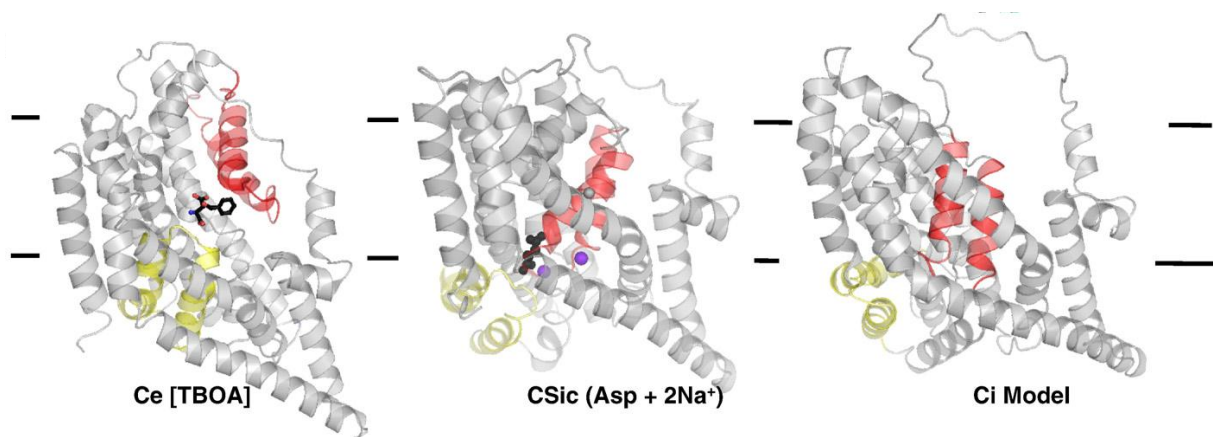


Abb. A16: **Verschiedene Konformationen von Glt<sub>Ph</sub>**. Dargestellt ist Glt<sub>Ph</sub> in nach außen offener Konformation (Ce) mit dem Inhibitor TBOA, in nach innen geschlossener Konformation (CSic) mit dem Substrat Aspartat sowie in nach innen offener Konformation ohne Substrat (Ci). (Quelle: Forrest et al., 2011).

## Anhang zu Kap. 5.2:

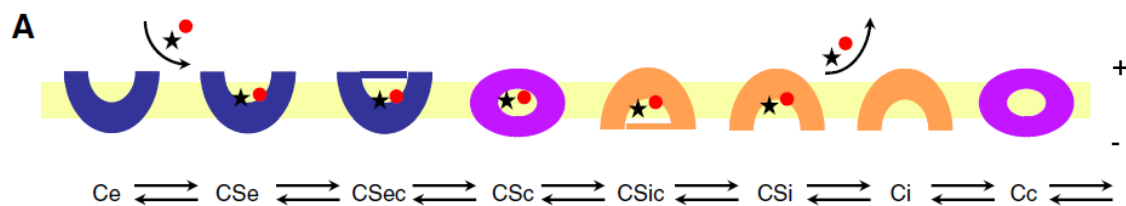


Abb. A17: **Schematische Darstellung verschiedener Konformationen eines Transporters**. Dargestellt ist ein Transporter in nach außen offener Konformation (Ce), in substratgebundener nach außen offener Konformation (CSe), in substratgebundener nach außen geschlossener Konformation (CSec), in substratgebundener geschlossener Konformation (CSc), in substratgebundener nach innen geschlossener Konformation (CSic), in substratgebundener nach innen offener Konformation (CSi), in nach innen offener Konformation (Ci) sowie in geschlossener Konformation ohne Substrat (Cc). (Geändert nach: Forrest et al., 2011).

Anhang zu Kap. 5.4:

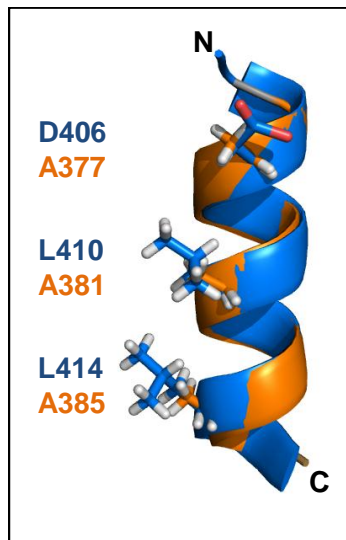


Abb. A18: Überlagerung der vorhergesagten 3D-Struktur der cytoplasmatischen Helices von **DcuB (orange)** und **DctA (blau)**. Die in DctA wichtigen Aminosäuren D406, L410 und L414 sind mit ihrer Seitenkette dargestellt. Die entsprechenden Positionen in der Helix XIb von DcuB A377, A381 und A385 sind ebenfalls mit der Seitenkette abgebildet.



## 8 Veröffentlichungen und Präsentationen

### Veröffentlichungen

Scheu, P. D.; Witan, J.; Rauschmeier, M.; Graf, S.; Liao, Y.-F.; Ebert-Jung, A.; Basché, T.; Erker, W.; Uden, G. (2012)  
The CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system *in vivo*.  
*J. Bacteriol* 194 (3), S. 636–645.

Witan, J.; Bauer, J.; Steinmetz, P.; Erker, W.; Uden, G. (2012)  
Functional interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS.  
(Manuskript eingereicht)

### Vorträge

Witan, J.; Uden, G. (2012)  
Functional interaction of the *Escherichia coli* transporters DctA and DcuB with the sensor kinase DcuS.  
Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Tübingen

Witan, J.; Uden, G. (2011)  
The C<sub>4</sub>-dicarboxylate carriers DctA and DcuB function as essential co-sensors for the C<sub>4</sub>-dicarboxylate sensor kinase DcuS.  
7th European Workshop on Bacterial Respiratory Chains, Lund, Schweden

Witan, J.; Uden, G. (2010)  
Interaction of the *Escherichia coli* C<sub>4</sub>-dicarboxylate carriers DctA and DcuB with the DcuSR two-component system.  
28th Symposium Mechanisms of gene regulation, Neustadt an der Weinstraße

### Poster

Witan, J.; Uden, G. (2011)  
Regulation of the *Escherichia coli* sensor histidine kinase DcuS by direct interaction with the C<sub>4</sub>-dicarboxylate carriers DctA and DcuB.  
Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Karlsruhe

Witan, J.; Bauer, J.; Erker, W.; Uden, G. (2010)  
Interaction of the *Escherichia coli* C<sub>4</sub>-dicarboxylate carrier DctA with the DcuSR two-component system.  
Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hannover