

Reinigung des C₄-Dicarboxylat-
Transporters DctA und dessen
regulatorischer Einfluss auf die Aktivität
der Sensorkinase DcuS

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Matthias Zeltner
geboren am 03. Juni 1984 in Groß-Gerau

Mainz, April 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2017

1 Zusammenfassung	08
2 Einleitung	09
2.1 Der Energiestoffwechsel in <i>Escherichia coli</i>	09
2.2 Die Regulation der Zellatmung in <i>Escherichia coli</i>	10
2.3 Der Transport von C ₄ -Dicarboxylaten in <i>Escherichia coli</i>	11
2.4 Allgemeine Funktion von Zweikomponentensystemen	13
2.5 Das Zweikomponentensystem DcuSR	13
2.6 Der Sensor-Komplex aus DcuS und DctA oder DcuB	16
2.7 Effektorbindung in DcuS durch PAS _p	16
2.8 Ziele dieser Arbeit	18
3 Material und Methode	20
3.1 Verwendete Stämme, Plasmide und Primer	20
3.1.1 Stämme	20
3.1.2 Plasmide	21
3.1.3 Oligonucleotide	22
3.2 Medien und Lösungen	23
3.2.1 Allgemein	23
3.2.2 Proteinüberproduktion und Isolierung	26
3.2.3 SDS-PAGE und <i>semi-dry Western-blotting</i>	27
3.2.4 Rekonstitution und Protein-Phosphorylierung	31
3.2.5 β-Galaktosidase-Test	31
3.3 Zellzucht	31
3.4 Molekulargenetische Methoden	33
3.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
3.4.2 Gerichtete Mutagenese	34

3.4.3 DNA-Gel-Elektrophorese	34
3.4.4 Herstellung kompetenter Zellen.....	35
3.4.5 Transformation von Plasmid-DNA.....	35
3.4.6 Stammhaltung.....	36
3.5 Die Konstruktion des Plasmids pMW1928	37
3.6 Proteinbiochemische Methoden	38
3.6.1 Überproduktion und Isolation von His ₆ -DctA und His ₆ -eCFP-L-DctA.....	38
3.6.2 Überproduktion und Isolation von His ₆ -DcuS	42
3.6.3 Rekonstitution von His ₆ -DcuS und His ₆ -eCFP-L-DctA in Liposomen.....	42
3.6.4 Phosphorylierung von rekonstituiertem His ₆ -DcuS	44
3.6.5 SDS-PAGE und semi-dry Western-blotting.....	45
3.6.6 Quantitative Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität	47
3.6.7 Transportmessung mit [2,3- ¹⁴ C]-Fumarat	48
3.7 Bioinformatik.....	49
3.7.1 Molekulares Docking.....	49
3.7.2 Software und Webseiten.....	50
4 Ergebnisse.....	52
4.1 Optimierung der Präparation von DctA	52
4.1.1 Überproduktion von His ₆ -DctA	52
4.1.2 Optimierung der Extraktion von His ₆ -DctA aus der Membran.....	55
4.1.3 Überproduktion von His ₆ -eCFP-L-DctA	58
4.1.4 His ₆ -eCFP-L-DctA bildet eine funktionale und eine disfunktionale Population	58
4.1.5 His ₆ -eCFP-L-DctA besitzt eine höhere Löslichkeit als His ₆ -DctA	60
4.2 Das His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukt verhält sich wie DctA_{wt}.....	63
4.2.1 Das His ₆ -eCFP-L-DctA-Konstrukt besitzt Transportfunktionalität.....	63
4.2.2 Das His ₆ -eCFP-L-DctA-Konstrukt ist regulatorisch aktiv.....	65

4.3 Optimierung der Rekonstitution von DcuS und DctA	67
4.3.1 Die Konzentration der DctA- und DcuS-Präparationen wurde gesteigert.....	67
4.3.2 His ₆ -eCFP-L-DctA und His ₆ -DcuS wurden in Membranvesikel rekonstituiert	68
4.4 Rekonstituiertes DcuS ist in Anwesenheit von DctA weniger aktiv	71
4.4.1 Nachweis der Phosphorylierung von His ₆ -DcuS mit dem Phosphoimager	71
4.4.2 Messung der Autophosphorylierung von His ₆ -DcuS mit dem Szintillationszähler	72
4.5 Substratspezifität von DcuS	75
4.5.1 Die DcuS-PAS _p -Domäne ist für L-Malat optimiert	76
4.5.2 DcuS-Varianten von Resten, die in DcuS und CitA subtypisch konserviert sind	78
4.5.2.1 DcuS-Varianten, die für Substrate mit großen Substituenten spezifisch sind	79
4.5.2.2 DcuS bevorzugt C ₄ -Dicarboxylate, die an C2 (S)-konfiguriert sind	80
4.5.3 Molekulares Docking - Die Bindung von C ₄ -Dicarboxylaten durch DcuS-PAS _p	82
5 Diskussion	87
5.1 Überproduktion von DctA.....	87
5.1.1 Isoliertes His ₆ -DctA ist disfunktional	87
5.1.2 Die Fusion von DctA mit eCFP erhöht den Anteil an aktivem Protein im Isolat	89
5.1.3 Weitere Optimierung der Überproduktion von DctA	92
5.2 Rekonstitution von DcuS und DctA	95
5.3 Regulation von DcuS durch DctA <i>in vitro</i>	96
5.3.1 Regulation in Zweikomponentensystemen und DcuSR.....	96
5.3.2 DctA inhibiert <i>in vitro</i> die Phosphorylierung von DcuS.....	98
5.3.3 Weitere Untersuchungen des DcuS/DctA <i>in vitro</i> Testsystems	100
5.4 Substratspezifität der Sensorkinase DcuS	101
5.4.1 Die DcuS-PAS _p -Domäne ist für das Substrat L-Malat optimiert.....	103
5.4.2 Andere C ₄ -Dicarboxylate werden von DcuS-PAS _p ähnlich wie L-Malat koordiniert.....	107
5.5 Ausblick.....	115

6 Literatur	116
A Anhang	127
A.1 Verwendete Chemikalien	127
A.2 Ergebnisse Molekulares Docking	128
A.3 Vergleich von DcuS-PAS _p und CitA-PAS _p mit gebundenem Substrat	129
B Abkürzungsverzeichnis	130
C Veröffentlichungen und Präsentationen	134
D Lebenslauf	135
E Danksagung	136

1 Zusammenfassung

Das Bakterium *Escherichia coli* detektiert C_4 -Dicarboxylate über das Zweikomponentensystem DcuSR, welches die Expression der zugehörigen Stoffwechselwege kontrolliert. Durch die Interaktion mit den Transportern DctA (aerob) und DcuB (anaerob) wird die Sensorkinase DcuS in die für C_4 -Dicarboxylate responsive Form überführt. Sind die Transporter deletiert, wird die Expression DcuS-regulierter Gene dauerhaft angeschaltet und die Aktivität von DcuS kann in *dcuB-lacZ*-Expressionsstudien durch Fumarat nicht weiter gesteigert werden. In dieser Arbeit wurde die Grundlage für ein definiertes System geschaffen, in dem die Phosphorylierung von DcuS in Abhängigkeit von DctA und Fumarat untersucht werden kann. DctA wurde mit eCFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) fusioniert und die Löslichkeit des Transporters gesteigert. Das His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukt war im Transport funktional und regulatorisch aktiv. Die Überproduktion und Isolierung von DctA wurde optimiert. Unter Verwendung des Detergenz Fos-Cholin-12 zur Extraktion des Proteins aus der Membran wurde die beste Reinheit und Ausbeute erreicht. Das Isolat war zu 95 % rein und enthielt ca. 50 % Protein, dessen Mobilität im SDS-Gel der für aktives (nicht denaturiertes) DctA typischen entsprach. DcuS und DctA wurden in extrahierten *E. coli* Membranen ko-rekonstituiert und die Phosphorylierung von DcuS gemessen. DctA war in ersten Versuchen in der Lage die maximale Phosphorylierung von DcuS mit und ohne Fumarat zu reduzieren und die Dephosphorylierung der Sensorkinase zu verzögern. Darüber hinaus wurde die Substratspezifität von DcuS-Varianten untersucht, in denen für die Substratbindung essentielle Aminosäuren ausgetauscht worden waren. Ergänzend dazu wurde die unter energetischen Gesichtspunkten wahrscheinlichste Positionierung der Effektoren in DcuS-PAS_p mit *Molekularem Docking* berechnet. DcuS stellte sich als für L-Malat optimiert heraus, und wird aufgrund der Konfiguration der Substituenten gegenüber anderen C_4 -Dicarboxylaten bevorzugt. Die Konfiguration von L-Malat ermöglicht die energetisch optimale Positionierung eines C_4 -Dicarboxylats innerhalb von DcuS-PAS_p. Andere C_4 -Dicarboxylate werden ähnlich wie L-Malat koordiniert.

2 Einleitung

2.1 Der Energiestoffwechsel in *Escherichia coli*

Das Gram negative Enterobakterium *Escherichia coli* besitzt einen anpassungsfähigen Stoffwechsel und kann sich auf ein wechselndes Angebot an Kohlenstoff- und Energiequellen bzw. unterschiedliche Elektronenakzeptoren einstellen. Da für die Bereitstellung der Stoffwechselwege ein hoher Energieaufwand vonnöten ist, werden diese nur bei Bedarf gebildet. Die verwertbaren Verbindungen werden einer hierarchischen Ordnung folgend genutzt, da diese einen unterschiedlichen Energiegewinn für die Zelle bedeuten (Gunsalus 1992). Die Regulation der Stoffwechselwege wird in vielen Fällen über Zweikomponentensysteme (ZKS) bewerkstelligt, die typischerweise aus einer Sensor kinase und einem Responseregulator bestehen (Stock *et al.* 2000; Krell *et al.* 2010; Mascher *et al.* 2006).

Unter aeroben Bedingungen nutzt *E. coli* bevorzugt Glukose als Energie- und Kohlenstoffquelle und unterdrückt die Verwertung anderer Substrate. Glukose wird über das Phosphotransferasesystem in die Zelle aufgenommen (Deutscher 2006). Bei einem niedrigen Glukosegehalt im Außenmedium wird das Enzym Adenylatcyclase aktiviert, welches die Umwandlung von ATP in cAMP katalysiert. Die steigende cAMP Konzentration in der Zelle induziert eine vermehrte Bildung des globalen Regulator-komplex cAMP-CRP (CRP = cAMP receptor protein), welcher alternative Stoffwechselwege auf Transkriptionsebene aktiviert. Sind keine Zucker im Außenmedium vorhanden, kann *E. coli* C₄-Dicarboxylate wie Succinat, Fumarat oder Malat in den Citratzyklus einschleusen und diese bis zur Oxidationsstufe von CO₂ oxidieren (Unden und Kleefeld 2004).

E. coli betreibt unter aeroben und anaeroben Bedingungen Zellatmung, wobei mögliche Elektronenendakzeptoren unterschiedlich favorisiert werden. Akzeptoren mit einem hohen Redoxpotential (E_0') bedeuten einen hohen Energiegewinn für die Zelle. Herrschen

aerobe Bedingungen, nutzt *E. coli* molekularen Sauerstoff mit einem Redoxpotential von $E_0' = 0,82 \text{ V}$ (Unden und Bongaerts 1997). In der Anaerobiose werden Nitrat und Nitrit gegenüber Dimethylsulfoxid (DMSO), Trimethylamin-N-oxid (TMAO) und Fumarat bevorzugt. Fumarat besitzt noch ein Redoxpotential von $E_0' = 0,03 \text{ V}$ (Unden und Bongaerts 1997). Betreibt die Zelle Fumaratatmung, so wird Fumarat zu Succinat reduziert, welches ausgeschieden wird. Succinat kann anaerob nicht in den Citratzyklus eingespeist werden, da dieser aufgrund einer Reprimierung des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex und einer Fehlenden Reoxidation von Ubichinol nicht vollständig abläuft (Spiro *et al.* 1989; Park *et al.* 1995; Prohl *et al.* 1998). Neben Fumarat können auch andere C_4 -Dicarboxylate wie L-Malat und D-Tartrat veratmet werden, allerdings werden diese zuvor in Fumarat umgewandelt (Unden und Kleefeld 2004; Engel *et al.* 1994). Sind extrazellulär keine nutzbaren Elektronenendakzeptoren vorhanden, so betreibt *E. coli* Gärung und überträgt die Elektronen auf Zwischenprodukte des Stoffwechsels.

2.2 Die Regulation der Zellatmung in *Escherichia coli*

E. coli veratmet vorzugsweise Sauerstoff und unterdrückt in dessen Anwesenheit alternative respiratorische Stoffwechselwege. Der Sensor FNR (fumarate nitrate reductase regulator) nimmt Sauerstoff direkt wahr und wird durch diesen in den inaktiven Zustand versetzt (Unden *et al.* 2002). Im aktiven Zustand aktiviert FNR als globaler Transkriptionsfaktor Gene des anaeroben Stoffwechsels (Unden *et al.* 1995; Spiro und Guest 1990). Das Zweikomponentensystem ArcBA (aerobic respiration control) perzipiert Sauerstoff indirekt (Bueno *et al.* 2012) und unterdrückt die Expression von Genen des aeroben Stoffwechsels. In der Anaerobiose werden Nitrat und Nitrit gegenüber Fumarat als Elektronenendakzeptor bevorzugt. Die Regulation geschieht über die Zweikomponentensystem (ZKS) NarXL bzw. NarPQ (Stewart *et al.* 1993; Rabin und Stewart 1993). Für die Veratmung von Fumarat benötigte Gene werden über das ZKS DcuSR aktiviert.

2.3 Der Transport von C₄-Dicarboxylaten in *Escherichia coli*

Escherichia coli verwendet unter aeroben und anaeroben Bedingungen unterschiedliche Transportsysteme um C₄-Dicarboxylate in bzw. aus der Zelle zu schleusen (Abb. 01 (Kay und Kornberg 1971; Engel *et al.* 1992)). In Anwesenheit von Sauerstoff werden die beiden Transporter DctA (dicarcoxylate transporter A) und DauA (dicarcoxylic acid uptake system A) genutzt (Janausch *et al.* 2002A; Karinou *et al.* 2013). DctA transportiert C₄-Dicarboxylate im Symport mit 3 Protonen, wenn sich *E. coli* in einem Milieu mit neutralem pH befindet (Gutowski und Rosenberg 1975, Groeneveld *et al.* 2010). Bei C₄-Dicarbonsäuren handelt es sich um schwache Säuren, weshalb diese bei einem pH-Wert von 5 hauptsächlich als Monocarboxylat vorliegen. Da DctA nur die Di-Carboxylat-Form transportiert, übernimmt DauA im sauren Bereich den Transport von C₄-Dicarboxylaten (Karinou *et al.* 2013). Bei einem pH-Wert von 7 werden sowohl DctA als auch DauA gebildet, der Transport von Succinat erfolgt allerdings nur über DctA (Karinou *et al.* 2013). DauA scheint jedoch für die volle Expression des *dctA*-Gens wichtig zu sein (Karinou *et al.* 2013). Der K_M-Wert von DctA liegt bei ca. 30 µM (Kay und Kornberg 1971; Lo *et al.* 1972). Die Affinität für Succinat von DauA liegt bei ca. 560 µM und ist bedeutend geringer (Karinou *et al.* 2013).

Anaerob unterliegt die Expression des *dctA*-Gens einer Repremierung durch ArcBA (Davies *et al.* 1999). Zudem wird die Expression von *dctA* durch den CRP-cAMP-Komplex positiv reguliert, welcher bei Abwesenheit von Glukose oder alternativ nutzbaren Zuckern gebildet wird. Das DcuSR-System induziert die Bildung des DctA-Proteins, wenn C₄-Dicarboxylate im Medium perzipiert werden.

In der Anaerobiose werden C₄-Dicarboxylaten durch DcuA, DcuB und DcuC (dicarcoxylate uptake transporter) transportiert. Mit DcuD wurde ein weiterer Transporter der Dcu-Familie identifiziert, dessen Gensequenz große Ähnlichkeit mit DcuC aufweist. Die Funktion von DcuD konnte bisher nicht näher charakterisiert werden

(Janausch *et al.* 1999a; Janausch *et al.* 2001). DcuA und DcuB sind eng verwandt und katalysieren den elektroneutralen Austausch von C₄-Dicarboxylaten oder den Symport derselbigen mit Protonen (Janausch *et al.* 2002a). DcuB ist unter anaeroben Bedingungen der Haupttransporter und sorgt für die Aufnahme von Fumarat im Antiport mit Succinat, welches bei der Fumaratatmung vermehrt in der Zelle gebildet wird.

Die Expression von *dcuB* wird positiv von FNR und dem globalen Transkriptionsfaktor CRP-cAMP reguliert, eine negative Kontrolle besteht durch NarXL (Golby *et al.* 1999). Bieten sich der Zelle unter anaeroben Verhältnissen keine Zucker als Nahrungsquelle an, so erfolgt bei Vorhandensein von C₄-Dicarboxylaten eine positive Regulation durch DcuSR. Der K_M-Wert von DcuB liegt bei ca. 100 µM (Janausch *et al.* 2002).

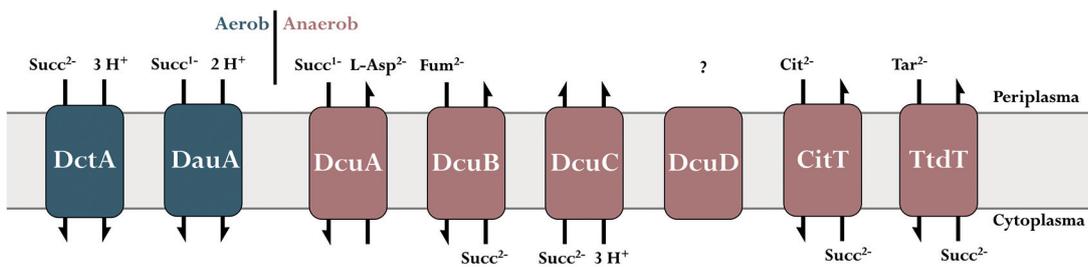


Abb. 01: C₄-Dicarboxylat-Transporter in *Escherichia coli* unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Succ²⁻ = Succinat²⁻, Fum²⁻ = Fumarat²⁻, L-Asp²⁻ = L-Aspartat²⁻, Cit²⁻ = Citrat²⁻, Tar²⁻ = Tartrat²⁻.

Die Bildung von DcuA erfolgt konstitutiv, unter aeroben Bedingungen erlaubt der Transporter jedoch kein Wachstum auf C₄-Dicarboxylaten. Deshalb wird eine posttranskriptionelle Inaktivierung durch Sauerstoff vermutet (Golby *et al.* 1999; Janausch *et al.* 2002). Die Funktion von DcuC ist vergleichbar mit den Mitgliedern der (Dcu)AB Familie, hauptsächlich scheint DcuC jedoch den Efflux zu katalysieren (Janausch *et al.* 2002A). Die Hauptfunktion wird im Ausschleusen von Succinat vermutet, welches bei der Glucosefermentation anfällt (Zientz *et al.* 1996, 1999).

Der Antiporter CitT vermittelt den Import von Citrat im Austausch mit Succinat. Obwohl CitT befähigt ist auch Tartrat oder Fumarat aus der Zelle zu transportieren, besteht die

physiologische Funktion wahrscheinlich im Export von Succinat, welches während der Citratfermentation anfällt (Pos *et al.* 1998). Bei TtdT handelt es sich um einen weiteren anaeroben Antiporter, der den Import von L-Tartrat im Austausch mit Succinat katalysiert (Kim *et al.* 2007b). TtdT spielt wahrscheinlich bei der Fermentation von L-Tartrat eine Rolle, bei der Succinat entsteht.

2.4 Allgemeine Funktion von Zweikomponentensystemen

Bakterien sind ständig wechselnden Umwelteinflüssen ausgesetzt und müssen auf diese entsprechend reagieren. Dabei kann es sich z.B. um ein wechselndes Angebot an Nährstoffen handeln, Änderungen in Osmolarität und pH-Wert des Außenmediums oder einer wechselnden Umgebungstemperatur. Häufig wird diese Anpassung durch Zweikomponentensysteme (ZKS) bewerkstelligt, von denen eine Zelle im Durchschnitt 52 besitzt (Cock und Witworth 2007). Das typische ZKS besteht aus der Sensor-Histidinkinase und dem Responseregulator. Da es sich häufig um Reize außerhalb der Zelle handelt, befinden sich viele Sensorkinasen innerhalb der Membran (83 % (Cock und Withworth 2007)). Die Aufgabe des Sensors ist es das Signal zu perzipieren und über die Membran in die Zelle weiterzuleiten. Der cytosolische Responseregulator wird durch eine Transphosphorylierung ausgehend von der Sensor-Histidinkinase aktiviert und beeinflusst als Transkriptionsfaktor die Expression der Zielgene.

2.5 Das Zweikomponentensystem DcuSR

Das Zweikomponentensystem DcuSR (dicarboxylate uptake sensor/regulator) besteht aus der Sensor-Histidinkinase (SK) DcuS und dem Responseregulator (RR) DcuR. Seine Aufgabe besteht in der Wahrnehmung von C₄-Dicarboxylaten im Außenmedium und der Regulation entsprechender Enzyme, die unter aeroben und anaeroben Bedingungen die

Aufnahme bzw. Verstoffwechslung derselbigen katalysieren (Zientz *et al.* 1998; Golby *et al.* 1999). DcuS ist eine membranständige SK und gehört zur CitA-Familie (Janausch *et al.* 2002a). Wie in Scheu *et al.* (2010A) gezeigt, bildet DcuS in der Membran ein Homodimer oder ein höheres Oligomer. DcuS besitzt 2 Transmembranhelices (TM 1 und TM 2), wobei die Funktion von TM 1 als Verankerung in der Membran zu sehen ist (Abb. 02). In TM 2 befindet sich ein SmallxxxSmall Motiv, über das der Dimerisierung der DcuS-Moleküle dient (Steinmetz 2014). Zwischen TM 1 und TM 2 befindet sich im Periplasma gelegen die PAS_p-Domäne (Per-Arnt-Sim), deren Aufgabe in der Wahrnehmung von C₄-Dicarboxylaten liegt (Golby *et al.* 1999; Pappalardo *et al.* 2003; Kneuper *et al.* 2005; Cheung und Hendrickson 2008). PAS_p kann eine Vielzahl verschiedener Effektoren binden, darunter L-Malat, Fumarat und D-Tartrat, aber auch Citrat, welches 6 Kohlenstoffatome besitzt. An TM 2 schließt sich im Cytoplasma die PAS_c-Domäne an, welcher die Kinase-Domäne folgt. Während TM 1 als Membrananker dient, erfolgt die Signalweiterleitung aus dem Periplasma über die Membran durch TM 2 (Scheu *et al.* 2002B). Wird im Periplasma ein Effektor gebunden, kontrahiert PAS_p und es erfolgt eine Zugbewegung. Diese wird durch eine Kolbenhubbewegung von TM 2 über die Membran weiter an PAS_c geleitet (Etzkorn *et al.* 2008; Monzel *et al.* 2015). Daraufhin kommt es in der cytoplasmatisch gelegenen Kinase-Domäne zur Autophosphorylierung des zweiten DcuS-Monomers, was zu der Bildung eines Phosphoramidats an H349 führt. Die Reaktion nutzt ATP als Phosphorylgruppendonator und erfordert Mg²⁺ als Kofaktor. Die Aktivierung des Responseregulators DcuR erfolgt durch Phosphoryltransfer der Phosphatgruppe von DcuS. Der Phosphatrest wird von H349 auf den Aspartatrest D56 in DcuR übertragen, was zu der Bildung eines DcuR-Dimers führt (Janausch *et al.* 2002b). Über ein Helix-Turn-Helix-Motiv bindet DcuR als Transkriptionsfaktor an die DNA und aktiviert die Expression der Zielgene. Unter aeroben Bedingungen reguliert DcuR die Expression des Transporters DctA (*dctA*) positiv (Abo-Amer *et al.* 2004), in der Anaerobiose wird die Bildung der Genprodukte von *frdABCD* (Fumaratreduktase), *fum B* (Fumarase B) und *dcuB* (Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB)

induziert (Zientz *et al.* 1998). Um eine Überaktivierung durch DcuR zu vermeiden, besitzt das Protein eine intrinsische Phosphataseaktivität. Zudem konnte ein Einfluss von DcuS auf die Dephosphorylierung von DcuR gezeigt werden (Krämer 2008).

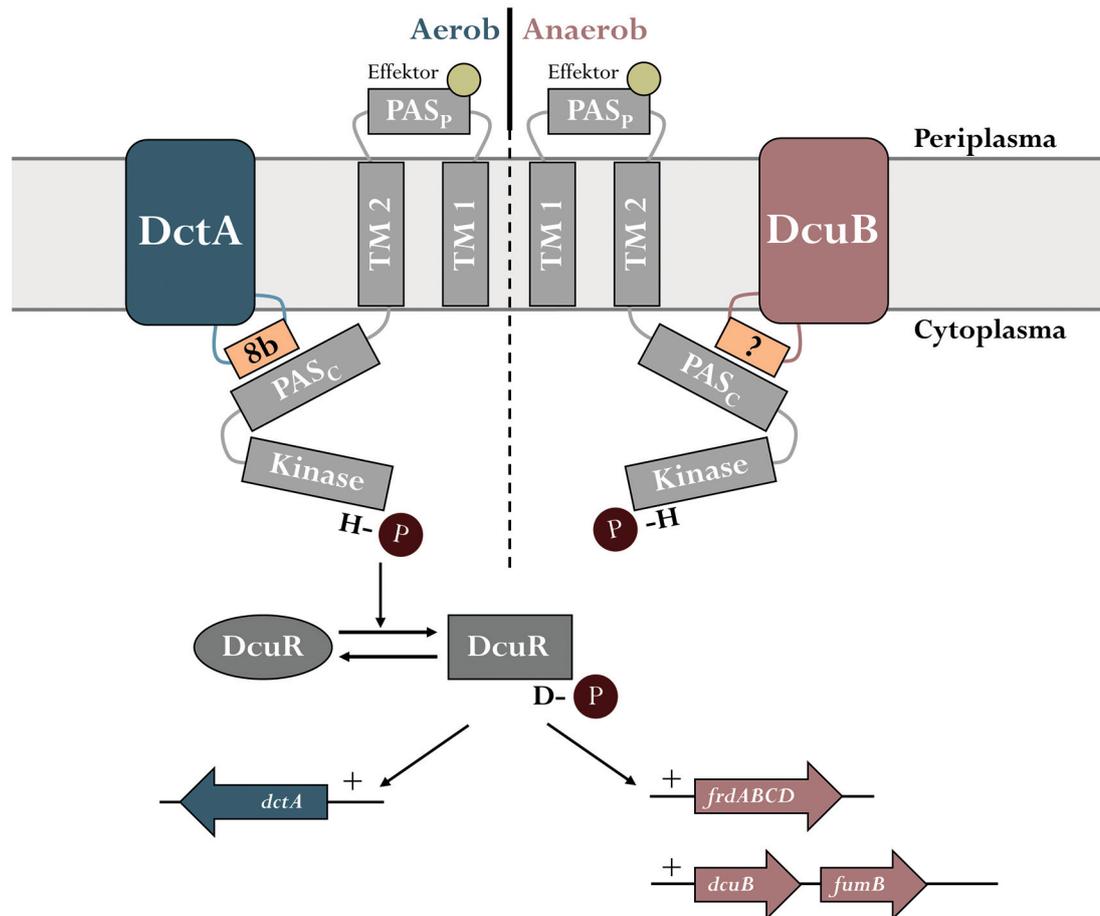


Abb. 02: Das DcuSR-System in aktiviertem Zustand nach Bindung eines Effektors durch DcuS. DcuS ist in hellem Grau als Homodimer dargestellt. In hellem Orange sind die beiden Interaktionsflächen von DctA (Helix 8b) und DcuB (unbekannt) mit PAS_C gezeigt. Die Interaktion von DcuS mit DctA oder DcuB versetzt die Sensorkinase in den Effektor-responsiven Zustand. Bei Bindung eines Effektors über PAS_P erfolgt die Signalweitergabe über die Membran durch eine Kolbenhubbewegung der TM 2 (Monzel *et al.* 2015). Dies führt zu einer Autophosphorylierung der Kinasedomäne an einem Histidinrest, welcher über eine Transphosphorylierung auf DcuR übertragen wird und den Responseregulator in den aktiven Zustand versetzt. Unter aeroben Bedingungen erfolgt die Stimulation des *dctA*-Gens (*dctA*) durch DcuR, unter anaeroben Bedingungen werden die Gene für die Fumaratreduktase (*frdABCD*), Fumarase B (*fumB*) und DcuB (*dcuB*) aktiviert.

2.6 Der Sensorkomplex aus DcuS und DctA oder DcuB

Bei DctA und DcuB handelt es sich um die beiden Haupttransporter für C_4 -Dicarboxylate unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen. DctA gehört zu der DAACS-Familie (dicarboxylic amino acid/cation symporter) und besteht aus 8 Transmembranhelices und zwei Haarnadelschleifen. Jeweils im Periplasma und im Cytoplasma befindet sich eine Helixstruktur (Helix 3b und 8b (Witan *et al.* 2012a)). DcuB besitzt 12 Transmembranhelices (Engel *et al.* 1994; Bauer *et al.* 2011) und gehört der Dcu-Familie an (dicarboxylate uptake). Neben ihrer Funktion im Transport wirken DctA und DcuB als Ko-Regulatoren und bilden mit der Sensor-Histidinkinase DcuS einen Sensorkomplex (Witan *et al.* 2012; Steinmetz *et al.* 2014). Die Interaktion zwischen DcuS und DctA wird durch PAS_C (DcuS) und Helix 8b (DctA) vermittelt (Witan *et al.* 2012a). Für DcuB ist die genaue Interaktionsstelle unbekannt. In vergangenen Arbeiten wurde in *dcuB* und *dctA*-negativen Stämmen eine effektorunabhängige Aktivierung von DcuS gezeigt (Davies *et al.* 1999; Kleefeld *et al.* 2009). Die Transporter werden für eine wildtypische Funktion von DcuS benötigt, weshalb eine Rolle dieser als Ko-Sensoren postuliert wurde. Da sich das Substratspektrum von DcuS und der Transporter unterscheiden (Steinmetz *et al.* 2014) und regulatorische und Transportfunktion unabhängig voneinander sind (Kleefeld *et al.* 2009; Steinmetz *et al.* 2014), muss DcuS als alleine Signaleingangsstelle dienen. DctA und DcuB versetzen DcuS demnach in einen für C_4 -Dicarboxylate responsiven Zustand.

2.7 Effektorbindung in DcuS durch PAS_p

Die Sensorkinase DcuS besitzt ein weites Substratspektrum und wird durch C_4 -Dicarboxylate sowie durch Citrat aktiviert. Zu den Effektoren zählen D- und L-Malat, Fumarat, Succinat, D- und L-Tartrat, Aspartat und Mesaconat, die von DcuS mit einer unterschiedlichen Affinität gebunden werden (Kneuper *et al.* 2005).

Die Effektorbindung in DcuS wird durch die periplasmatische PAS_p-Domäne (Per-Arnt-Sim-Domäne) vermittelt (Golby *et al.* 1999; Pappalardo *et al.* 2003; Kneuper *et al.* 2005; Cheung und Hendrickson 2008). Cheung und Hendrickson gelang es (2008) die PAS_p-Domäne (DcuS 42 - 181) mit gebundenem L-Malat zu kristallisieren und die 3D-Struktur mittels Röntgenkristallographie zu entschlüsseln (Abb. 03). Die strukturelle Bildung der Bindetasche erfolgt durch entsprechende Anordnung von β -Faltblattstrukturen und β -Schleifen, in denen die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren lokalisiert sind. Die Koordination von L-Malat geschieht hauptsächlich über Wasserstoffbrücken, die zwischen den Sauerstoffatomen der Carboxyl- und Hydroxyl-Gruppen des Proteinrückgrats oder der Seitenketten und dem Liganden ausgebildet werden. Die Aminosäuren Arg107, His110 und Arg147 sind mit ihrer Seitengruppe an der Bindung des Liganden beteiligt, Lys121, Gly140, Phe141 und Leu142 über das Protein Rückgrat (Abb. 03). Zudem bildet L-Malat eine Wasserstoffbrücke über die distale Carboxylgruppe mit einem Wasser-Molekül aus, welches durch Arg147 und Ala143 koordiniert ist. Die Reste Phe97 und Phe120 interagieren mit L-Malat über hydrophobe Wechselwirkungen. Ob ein Effektor von der PAS_p-Domäne erkannt wird, hängt mit dem Abstand der endständigen Carboxylat-Gruppen des C₄-Dicarboxylats zusammen (Kneuper 2005). Effektoren, die DcuS aktivieren, weisen einen Abstand von 3,1 Å (Maleinat) bis 3,8 Å (gesättigte C₄-Dicarboxylate) auf. Effektoren, deren Abstand geringer oder größer ist, werden von DcuS nicht erkannt. Substitutionen durch Hydroxyl-Gruppen am zweiten und dritten Kohlenstoffatom werden toleriert. Effektoren mit größeren Substituenten wie z.B. Carboxyl-Gruppen (Citrat) aktivieren DcuS, sofern diese nicht zu voluminös sind (Phtalat). Innerhalb der CitA/DcuS-Familie sind die an der Bindung beteiligten Reste sehr stark konserviert (Kneuper *et al.* 2005; Krämer *et al.* 2008). Durch den gezielten Austausch der Reste ändert sich die Substratspezifität von DcuS (Kneuper *et al.* 2005; Krämer *et al.* 2007). Es wurden Varianten von DcuS erstellt, die entweder für C₄-Dicarboxylate oder für Mesaconat und Citrat responsiv waren, oder die durch Effektoren nicht mehr aktiviert werden konnten.

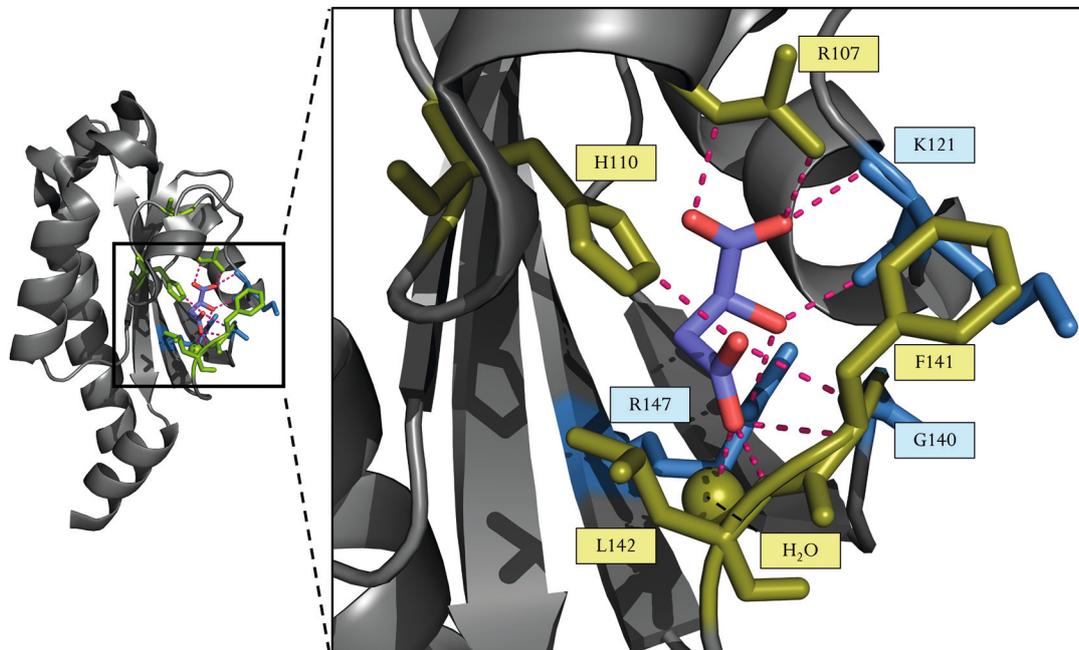


Abb. 03: Die Substrat-Bindetasche PAS_p in DcuS mit gebundenem L-Malat. PAS_p (DcuS 42 - 181) wurde mit gebundenem L-Malat kristallisiert und die Struktur per Röntgenkristallographie aufgelöst (Cheung und Hendrickson 2008). In Grün und Blau sind die an der Bindung von L-Malat direkt beteiligten Aminosäuren dargestellt. Die unterschiedliche Färbung wurde zwecks der Übersichtlichkeit gewählt. Zudem findet eine Interaktion von L-Malat mit einem Wasser-Molekül statt, welches von R147 und A143 gebunden wird. Polare Interaktionen zwischen dem Liganden und PAS_p sind pink dargestellt. Die Struktur hat die Kennung 3by8 in der RCSB PDB und wurde mit PyMol 1.3 visualisiert.

2.8 Ziele dieser Arbeit

Das Zweikomponentensystem DcuSR in *Escherichia coli* ist für die Detektion von C₄-Dicarboxylaten und die Expression der zugehörigen Stoffwechselwege verantwortlich (Unden *et al.* 2016). Das Protein DctA fungiert unter aeroben Bedingungen als C₄-Dicarboxylat-Transporter und Ko-Regulator für DcuS, welches die Sensorkinase in den für Substrate responsiven Zustand versetzt (Witan *et al.* 2012). In dieser Arbeit sollte ein System etabliert werden, in dem die Aktivität von DcuS in Abhängigkeit von DctA

und Fumarat *in vitro* unter definierten Bedingungen untersucht werden kann. Dafür sollten DcuS und DctA isoliert und in *E. coli* Membranen ko-rekonstituiert werden. DcuS wurde bereits erfolgreich überproduziert und isoliert (Janausch *et al.* 2002). Da die Überproduktion und Isolation von Membranproteinen in katalytisch aktiver Form vergleichsweise schwierig ist und unterschiedliche Proteine individuelle Anforderungen haben, sollten die optimalen Bedingungen für DctA experimentell ermittelt werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, wie DcuS Substrate in der PAS_p-Domäne koordiniert. Während die Struktur von DcuS-PAS_p mit gebundenem L-Malat röntgenspektroskopisch geklärt wurde (Cheung und Hendrickson 2008), ist unklar, wie DcuS die relativ breite Substratspezifität realisiert (Kneuper *et al.* 2005). Die Bindungsmodi für andere Substrate sollten über die geänderte Substratspezifität von DcuS-Varianten abgeleitet werden, in denen konservierte und für die Substratbindung essentielle Aminosäuren ausgetauscht wurden. Ergänzend dazu sollten mit *Molekularem Docking* wahrscheinlichste Positionierungen der Substrate innerhalb von DcuS-PAS_p in der L-Malat-Konfiguration berechnet werden.

3 Material und Methode

3.1 Verwendete Stämme, Plasmide und Primer

3.1.1 Stämme

Tabelle 01: Verwendete E. coli Stämme.

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
AN387	Wildtyp, <i>Escherichia coli</i> , F ⁻ , <i>rpsL</i> , <i>gal</i>	Wallace und Young 1977
BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	Studier und Moffat 1986
MC4100	F ⁻ <i>araD139 Δ(argF-lac)U169, rpsL150, (ΔlacZ), relA1 flbB530 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Silhavy <i>et al.</i> 1985
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺, lacI_q lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985
C43(DE3)	Spontane Mutation von BL21(DE3) für die Überproduktion von Membranproteinen	Miroux und Walker 1996
IMW260	MC4100, aber <i>λ[Φ(dcuB⁻-lacZ)hyb, bla⁺] dcuS::Cam^R</i>	Zientz <i>et al.</i> 1998
IMW503	MC4100, aber <i>λ[Φ(dcuB⁻-lacZ)hyb, bla⁺] ΔdcuB</i>	Kleedfeld <i>et al.</i> 2009
MDO800	AN387, aber <i>dctA::Spc^R</i>	Six <i>et al.</i> 1994
XL1-blue	F ⁻ , <i>recA1⁻, (mk⁺, rk⁻) supE44, endA1, thi-1, λ⁻, gyrA96, relA1, (lac⁻) [F⁻, proAB, lacI_q, ZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
XL10-Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacI_qZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cam^R)]</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA

3.1.2 Plasmide

Tabelle 02: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pET28a	Überexpressionsplasmid, His ₆ -Tag, Kan ^R , T7-Promoter	Novagen
pBAD18k	Überexpressionsplasmid, Kan ^R , araBAD-Promoter	Guzman <i>et al.</i> 1995
pBAD18k*	pBAD18k, aber eine <i>HindIII</i> -Schnittstelle deletiert, Kan ^R	Scheu <i>et al.</i> 2010a
pMW151	pET28a mit 1,6 kb <i>NdeI/HindIII</i> -Fragment von <i>dcuS</i> , His ₆ -tag, Kan ^R	Janausch <i>et al.</i> 2002b
pMW1440	His ₆ -DctA, pBAD18k*-Derivat	Zeltner 2012
pMW517	eCFP-dctA über <i>NcoI/BamHI</i> in pET28a	Bauer 2010
pMW1194	His ₆ -DctA-His ₆ , pBAD18k*-Derivat	Witan <i>et al.</i> 2012a
pMW1928	His ₆ -eCFP-L-DctA, pBAD18k*-Derivat	Diese Arbeit
pMW181	pET28a mit <i>dcuS</i> (<i>XbaI/HindIII</i>), eigener Promotor, Kan ^R	Kneuper <i>et al.</i> 2005
pMW236	pMW181, aber DcuS-H110A, Kan ^R	Kneuper <i>et al.</i> 2005
pMW237	pMW181, aber DcuS-R147A, Kan ^R	Kneuper <i>et al.</i> 2005
pMW292	pMW181, aber DcuS-F120A, Kan ^R	Kneuper <i>et al.</i> 2005
pMW344	pMW181, aber DcuS-T101G, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> 2007
pMW353	pMW181, aber DcuS-T101G-F120M-I125S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> 2007
pMW354	pMW181, aber DcuS-F141S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> 2007
pMW368	pMW181, aber DcuS-F120M, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> 2007
pMW278	pMW181, aber DcuS-F149K, Kan ^R	Kneuper <i>et al.</i> 2005
pMW355	pMW181, aber DcuS-Q159V, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> 2007
pMW373	pMW181, aber DcuS-I125S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> 2007
pMW398	pMW181, aber DcuS-R107A, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> 2007
pMW2390	pMW181, aber DcuS-K121A, Kan ^R	Diese Arbeit

3.1.3 Oligonucleotide

Tabelle 03: In dieser Arbeit für die Konstruktion von pMW1928 verwendete Oligonucleotide. Unter „Funktion“ sind eingefügte Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme oder Aminosäure Austausche vermerkt.

Oligo	Sequenz (5' - 3')	Funktion
1440_dctA_f	GGTCGCGAAGCTTCTATGAAAACCTC	EcoRI
1440_dctA_r	CCGCCAAAACAGAAGCTTTTAAGAGG	HindIII
517_eCFP_f	GTACCGGTCCATATGATGGTG	NdeI
517_eCFP_r	CTAGAGTCGCGGAATTCTAACTTG	EcoRI
1838_SpeI_f	GAGCTGTACAAGTTAGAATTCGCGACTAGTATGAAAACCTCTCTG	SpeI
1838_SpeI_r	CAGAGAGGTTTTTCATACTAGTCGCGAATTCTAACTTGTACAGCTC	SpeI
Linker_SpeI_	AATTCAACAATAACAATCTCGGAATCGACACTACGGAGAACC-	Linker
EcoRI_f	TGTATTTCCAGGTATGTCGTCTGGCCTAGTCCCACGTGGCAGCGC- TGGTAGTAGGGGAGCAA	
Linker_SpeI_	CTAGTTGCTCCCCTACTACCAGCGCTGCCACGTGGGACTAGGCCA-	Linker
EcoRI_r	GACGACATACCCTGGAAATACAGGTTCTCCGTAGTGTGATTCCGA- GATTGTTATTGTTG	
eCFP-dctA_f	CGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTG	XbaI
eCFP_dctA_r	CGGCCGCAAGCTTTTAAGAGG	HindIII
A206K_ecfp_f	GAGCACCCAGTCC AAG CTGAGCAAAGAC	A206K
A206K_ecfp_r	GTC TTT GCT CAG CTT GGA CTG GGT GCT C	A206K
DctA-L414A_f	CTG GAC GAT GTG GCG AAT AAT CGT GCG CCG	L414A
DctA-L414A_r	CGG CGC ACG ATT ATT CGC CAC ATC GTC CAG	L414A

Tabelle 04: In dieser Arbeit verwendete Primer für die Sequenzierung oder Mutagenese.

Oligo	Sequenz (5' - 3')	Funktion
T7_prom	TAATACGACTCACTATAGG	Sequenzierung
T7_term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierung
pBAD_f	CGGTACCCGGGGATCCTCTAG	Sequenzierung
pBAD_r	CGGCCGCAAGCTTTTAAGAGG	Sequenzierung
PAS _p -K121A_f	CAGCCATTTGCAGGTGATGACAT	K121A
PAS _p -K121A_r	ATGTCATCACCTGCAAATGGCTG	K121A

3.2 Medien und Lösungen

3.2.1 Allgemein

LB-Medium (Sambrook und Russell 1989)

- 10 g/l Casein
- 5 g/l Hefeextrakt
- 5 g/l NaCl

LB-Agar

LB-Medium mit

- 15 g/l Agar-Agar

SOC-Medium

- 26,64 g/l SOB-Medium
- 20 mM Glucose

Antibiotika

Wurden mehrere Antibiotika kombiniert, so wurde die Endkonzentration halbiert.

Tab. 05: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml in EtOH	20 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Streptomycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Tetracyclin	15 mg/ml in H ₂ O/EtOH (1:1)	15 µg/ml

10x M9-Stammlösung

75 g/l Na₂HPO₄

30 g/l KH₂PO₄

5 g/l NaCl

10 g/l NH₄Cl

Eingestellt auf pH 7.

eM9-Medium (Miller 1992; Kim *et al.* 2007)

1x M9-Stammlösung

10 ml/l 10 mM CaCl₂

1 ml/l 2 M MgSO₄

10 ml/l 10 % AHC

5 ml/l 1 % L-Tryptophan

eM9-Medium Kohlenstoffquellen, Elektronenakzeptoren

- 10 mM Glycerin (aerob)
- 50 mM Glycerin (anaerob)
- 20 mM Dimethylsulfoxid (DMSO)

eM9-Medium Effektoren

- Na₃Citrat, pH 7
- Na₂Fumarat, pH 7
- L-Malat, pH 7
- Maleinat, pH 7
- 3-Nitropropionat, pH 7
- Na₂Succinat, pH 7
- L-Tartrat, pH 7

Die M9-Stammlösung und die weiteren Zusätze wurde getrennt angesetzt und autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

TSB-Puffer

LB-Medium mit folgenden Zusätzen

- 100 g/l PEG 6000
- 2,46 g/l MgSO₄
- 2,03 g/l MgCl₂
- 100 ml/l DMSO

Die Lösung wurde steril filtriert.

Glycerin-MOPS-Puffer

- 1 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)
- 15 % (v/v) Glycerin

TAE-Puffer

- 40 mM Tris
- 20 mM Essigsäure
- 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (Na₂-EDTA)

3.2.2 Proteinüberproduktion und Isolierung

Waschpuffer für die Zellen (Puffer A)

- 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5
- 1 mM Na₂-EDTA, pH 8
- 500 mM NaCl
- 1 mM Dithiothreitol (DTT)

Nach Zugabe von DTT Lagerung bei 4 °C und bis zu 2 Wochen verwendet.

Homogenisierungspuffer für die Zellmembranen (Puffer B)

- 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8
- 10 % Glycerin
- 1 mM Dithiothreitol (DTT)

Nach Zugabe von wurde der Puffer bei 4 °C gelagert und innerhalb von zwei Wochen verbraucht.

Dialysepuffer nach Proteinisolation

- 500 mM NaCl
- 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8
- 10 % (v/v) Glycerin

Bindepuffer (BP) / Waschpuffer (WP) / Elutionspuffer (EP) (Ni²⁺-NTA-Säule)

500 mM NaCl

50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8

10 % (v/v) Glycerin

1 mM Dithiothreitol (DTT)

0,1 % (v/v) Detergenz

XX mM Imidazol

BP =10 mM Imidazol, WP=30 mM Imidazol, EP=500 mM Imidazol.

3.2.3 SDS-PAGE und *semi-dry Western-blotting*

Trenngel-Puffer

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

Sammelgel-Puffer

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

4x Trenngel (12 %)

6,5 ml H₂O

8 ml 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid

5 ml Trenngel-Puffer

200 µl 10 % SDS

20 µl N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)

50 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS)

4x Sammelgel

- 4,7 ml H₂O
- 1,9 ml 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid
- 2,1 ml Sammelgel-puffer
- 81 µl 10 % SDS
- 22 µl N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)
- 20 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS)

10x SDS-PAGE Auftragspuffer (nach Laemmli 1970)

- 186 ml/l H₂O
- 814 ml/l 86 % Glycerin
- 60,6 g/l Tris
- 250 g/l SDS

Eingestellt auf pH 6,8.

- 200 mg/l Bromphenolblau

Direkt vor Verwendung Zugabe von

- 5% (v/v) 2-Mercapthoethanol

10x SDS-PAGE Laufpuffer

- 250 mM Tris
- 1.92 M Glycin
- 1 % (w/v) SDS

SDS-PAGE Entfärbelösung

- 100 ml/l Eisessig
- 100 ml/l Ethanol

SDS-PAGE Coomassie Färbelösung

500 ml/l EtOH

2,5 g/l Coomassie R250

Für 1 h auf dem Magnetprüher gerührt.

100 ml/l Eisessig

400 ml/l H₂O

Western Blot Transfer-Puffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

20 % (v/v) EtOH

Western Blot Ponceau Rot Färbelösung

0,5 % (w/v) Ponceau S

3 % (v/v) TCA

10x PBS (Sambrook und Russell 1989)

1,37 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na₂HPO₄

20 mM KH₂PO₄

Eingestellt auf pH 7,5.

Western Blot Membran Waschpuffer

1x PBS

0,1 % (v/v) Tween 20

Western Blot Blockingpuffer

- 1x PBS
- 5 % (w/v) Skim Milk Powder
- 0,1 % (v/v) Tween 20

Western Blot Antikörperlösung

- 1x PBS
- 3 % (w/v) Bovine Serumalbumin (BSA)
- 0,1 % (v/v) Tween 20
- Antikörper

Antikörper

Primäre Antikörper

Anti-His₆, Maus (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Für Chemilumineszenz Entwicklung in der Verdünnung 1:10 000 eingesetzt.

Sekundärer Antikörper

Anti-IgG-Maus, gekoppelt mit HRP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Für Chemilumineszenz Entwicklung in der Verdünnung 1:20 000 eingesetzt.

Western Blot Chemilumineszenz Entwicklung

Substrat: Immobilon Western HRP Substrat (Merck Millipore, Darmstadt)

Filme: LucentBlue (Advansta, Menlo Park, CA, USA)

3.2.4 Rekonstitution und Protein-Phosphorylierung

Phosphorylierung Reaktionspuffer

- 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH8
- 150 mM NaCl
- 10 % (v/v) Glycerin
- 1 mM Dithiothreitol (DTT)

3.2.5 β -Galaktosidase-Test

β -Galaktosidase-Puffer

- 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0
- 10 mM KCl
- 1 mM $MgCl_2$
- 0,005 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
- 0,00025 % (w/v) Natriumdesoxycholat
- 2,7 ml 2-Mercaptoethanol

Lösungen für die Durchführung des β -Galaktosidase-Tests

- 4 mg/ml o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG)
- 1 M Na_2CO_3

3.3 Zellzucht

Genetische Arbeiten

Für alle genetische Arbeiten wurde *E. coli* in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium gezüchtet. Die Kulturen wurden aerob bei 37 °C inkubiert. Die Reagenzgläser wurden

in Schrägstellung bei 150 UpM geschüttelt (EXCELLA E24; New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Benötigte Antibiotika wurden wie angegeben verwendet.

Untersuchung der Transportfähigkeit der DctA-Konstrukte

Kulturen um die Transportfähigkeit DctA-Konstrukte *in vivo* zu untersuchen wurden aerob in 10 ml eM9-Minimalmedium mit entsprechenden Zusätzen und Effektoren bei 37 °C gezüchtet. Als Kohlenstoffquelle diente Fumarat (50 mM). Die Zucht erfolgte in 50 ml Schikanekolben. Die Induktion der von pBAD18k derivierten Plasmide (pMW1440/pMW1928) erfolgte mit 50 µM Arabinose. Die Hauptkulturen wurde 2%ig angeimpft. Vorkulturen wurden aerob in 5 ml eM9-Medium in Reagenzglasern gezüchtet. Die Kulturen wurden bei 150 UpM geschüttelt (EXCELLA E24; New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA).

Überproduktion von His₆-eCFP-L-DctA und His₆-DcuS

Die Überproduktion von His₆-DctA (pMW1440), His₆-eCFP-L-DctA (pMW1928) und His₆-DcuS (pMW151) erfolgte in *E. coli* C43(DE3). Je Protein und Überproduktion wurden 4x 400 ml LB-Medium verwendet. Die Zucht erfolgte in 2 l Schikanekolben bei 30 °C aerob. Die Kulturen wurden bei 150 UpM geschüttelt (Model G25; New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Bei OD₅₇₈ 0,5 wurde mit 600 µM Arabinose induziert. Die Hauptkulturen wurden 4%ig aus einer 100 ml Vorkultur in 2x 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen angeimpft. Antibiotika wurden wie angegeben eingesetzt.

Anaerobe Reportergergenmessung

Anaerobe Zuchten für die Messung der Reportergergenfusion *dcuB-lacZ* wurden in 96-Deep-Well-Platten kultiviert. In jedem Well befand sich 1 ml eM9-Medium. Glycerin (50 mM) diente als Kohlenstoffquelle, DMSO (20 mM) als Elektronenakzeptor. Effektoren wurden 20 mM verwendet. Die Vorkulturen wurden für 24 h bei 37 °C semi-anaerob inkubiert. Die

Hauptkulturen wurden 1%ig (mit Effektor) bzw. 10%ig (ohne Effektor) angeimpft. Um die Kulturen zu anaerobisieren wurden die 96-Well-Deep-Well-Platten mit entsprechenden Gummiabdeckungen versehen und in Anaerobentöpfen inkubiert. Die Töpfe wurden für 10 min vakuumisiert und dann mit Stickstoff begast. Die Hauptkulturen wurden für 18 h (Na_2 -Fumarat, Citrat, L-Malat, L-Tartrat, Aspartat, Mesaconat) bzw. 27 h (ohne Effektor, Succinat, D-Malat, D-Tartrat) bei 37 °C kultiviert. Die Kulturen wuchsen bis zu einer OD_{570} 05 - 08 und wurden dann im β -Galaktosidase Test eingesetzt (siehe 3.6.6).

3.4 Molekulargenetische Methoden

Molekularbiologische Methoden wurden nach Sambrook und Russel 2001 durchgeführt. Standardprodukte für Molekulargenetische Methoden stammen von Thermo Fisher Scientific Biosciences, St. Leon-Rot. Dazu zählen Restriktionsenzyme, Alkaline Phosphatase, DNA-Polymerasen, dNTPs, T4-DNA-Ligase und DNA-Leitern. Die Isolation und Reinigung von Nukleinsäuren wurde mit fertigen Kits (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, GenElute™ PCR Purification Kit, GenElute™ Gel Extraction Kit) der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen durchgeführt. Oligonukleotide wurden sowohl von MWG-Biotech AG, Ebersberg als auch von Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen. Die Sequenzierung Plasmiden wurde von der Firma LGC Genomics, Berlin durchgeführt.

3.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Sequenzen wurden die Komponenten entsprechend Tabelle 06 eingesetzt. Es wurde entweder die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase oder die *Pfu* DNA Polymerase (beide Thermo Fisher Scientific Biosciences, St. Leon-Rot) verwendet. Die Reaktionen wurden im iCycler oder im MyCycler (beide Bio-rad, Hercules, CA, USA) durchgeführt. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge

des zu synthetisierenden Amplifikats. Die Anlagerungstemperatur der Primer richtete sich nach der Schmelztemperatur der Oligonukleotide nach Herstellerangabe und der Herstellerprotokolle der DNA-Polymerasen.

Tab. 06: Komponenten eines PCR-Ansatzes.

Komponente	Phusion	Pfu
PCR-Puffer	1x Phusion Buffer	1x <i>Pfu</i> Buffer + MgSO ₄
dNTP-Mix (10 mM)	250 µM	250 µM
Primer (10 mM)	0,5 µM	0,5 µM
Template DNA	50 ng	50 ng
Polymerase	1 U	2,5 U
H ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl

3.4.2 Gerichtete Mutagenese

Für den gerichteten Austausch von Basenpaaren in Gensequenzen wurde das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet. Nach Durchführung der Mutagenese-PCR entsprechend 3.5.1, wurde das Restriktionsenzym *DpnI* verwendet um maternale DNA ohne Mutation zu verdauen. Die Mutationen wurden durch die Verwendung von Primern herbeigeführt, die komplementär zur Zielsequenz sind und die Mutation beinhalten. Die DNA wurde in *E. coli* XL1-Blue oder *E. coli* XL10-Gold transformiert (siehe 3.5.5), um die Plasmid-DNA ringförmig zu schließen.

3.4.3 DNA-Gel-Elektrophorese

DNA Fragmente wurden in 2%igen (w/v) Agarose Gelen separiert. Durch Erhitzen in einer Mikrowelle wurde die Agarose (Agarose NEEO Ultra-Qualität, Carl Roth GmbH,

Karlsruhe) in TAE-Puffer gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurden 2,5 µl/100 ml Ethidiumbromid zugegeben. Die Elektrophorese wurde für ca. 40 min durchgeführt und die Spannung konstant auf 110 V gehalten.

3.4.4 Herstellung kompetenter Zellen

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen erfolgte nach Farinha *et al.* (1990). Die Zellen wurden in LB-Medium gezüchtet und bei Bedarf Antibiotika zugesetzt. Die Vorkulturen hatten ein Volumen von 5 ml in Reagenzgläsern und wuchsen aerob bei 37 °C. Die Hauptkulturen wurden 2%ig angeimpft und wuchsen in Schikanekolben bei 37 °C und bis zu einer OD₅₇₈ 0,5 - 0,6. Ab dem Zeitpunkt der Zellernte (4500 UpM / 10 min / 4 °C / Rotor JA-10 / J2MC; Beckmann Coulter, Brea, CA, USA) wurden diese auf Eis gelagert. Es folgten drei Waschschriffe mit gekühltem Glycerin-MOPS-Puffer, dessen Volumen 1/8 der Kultur betrug. Das resultierende Zellpellet wurde in Glycerin-MOPS-Puffer resuspendiert, dessen Volumen 1/100 der Kultur entsprach. Die Zellen wurden portioniert und bei -80 °C gelagert.

Herstellung hitzekompetenter Zellen

Die Herstellung von hitzekompetenten Zellen erfolgte analog zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen. Statt Glycerin-MOPS-Puffer wurde TSB-Puffer verwendet.

3.4.5 Transformation von Plasmid-DNA

Transformation durch Elektroporation

Elektroporation wurde nach Dower *et al.* (1988) durchgeführt. Wurde ein Ligationsansatz transformiert, so wurden 50 - 100 µl elektrokompetente Zellen mit 5 - 10 µl Ligationsansatz

gemischt und in eine sterile Elektroporationsküvette gegeben. Wurden isolierte Plasmide oder der Ansatz einer gerichteten Mutagenese transformiert, so wurden 50 µl Zellen und 40 ng DNA eingesetzt. Mit dem Elektroporationsgerät (Eporator; Eppendorf, Hamburg) wurde ein Impuls von 2500 V gegeben. Die Zellen wurden sofort mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 2 h bei 37 °C und 300 UpM auf einem Thermoblock (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg) in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß inkubiert. Der Elektroporationsansatz wurde abzentrifugiert (10k UpM / 1 min / Rotor 3325B / Biofuge Pico; Heraeus, Hanau) und das Pellet in 50 µl SOC-Medium resuspendiert. Wurde isoliertes Plasmid transformiert, so wurde der Ansatz nicht abzentrifugiert und 50 - 100 µl direkt entnommen. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation durch Hitzeschock

Die Hitzeschock-Methode wurde nur bei der Durchführung von gerichteten Mutagenesen eingesetzt. Es wurden 100 µl hitzekompetente Zellen mit 3 µl DNA versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 2 min im Thermoblock einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt. Es folgte eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Nach der Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Zellen für 2 h bei 37 °C und 300 UpM auf einem Thermoblock (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und in 50 µl SOC-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf LB-Agar Platten mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.4.6 Stammhaltung

Vor der Aufnahme eines Plasmids in die Stammhaltung, wurde dessen Sequenz bestätigt. Es folgte die Transformation in *E. coli* JM109. Mit einem isolierten Klon wurde ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium und entsprechenden Antibiotika beimpft und über

Nacht gezüchtet. Die Kultur wurde in einem sterilen Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert (8000 UpM / 10 min / 4 °C / Rotor 16F6-38 / Kühl-Zentrifuge 5403; Eppendorf, Hamburg) und das Pellet in 1 ml LB-Medium aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml 50%igem Glycerin wurden die Zellen auf zwei sterile Eppendorf-Gefäße mit Schraubdeckel aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

3.5 Die Konstruktion des Plasmids pMW1928

Bei den Plasmiden pMW1440 (His₆-DctA) und pMW1928 (His₆-eCFP-L-DctA) (Abb. 04) handelt es sich um Derivate des pBAD18k Vektors (Guzman *et al.* 1995). Die Expression des pBAD18k Vektors lässt sich über Arabinose und Glukose regulieren, weshalb dieser für die Überproduktion von Membranproteinen geeignet ist. Die Konstruktion von pMW1440 im Detail wurde in Zeltner, 2012 erläutert. Die Konstruktion von pMW1928 erfolgte ausgehend von dem Vektor pET28a, da dieser die Fusion mit einem His₆-Tag ermöglicht und eine Ribosomenbindestelle besitzt, welche auf pBAD18k nicht vorhanden ist. Das *dctA*-Gen wurde mit den Primern 1440_dctA_r und 1440_dctA_r aus dem Plasmid pMW1440 amplifiziert und über die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* in pET28a inkloniert, was zur pMW1837 führte. Die Amplifikation von *ecfp* erfolgte aus pMW517 mit den Primern 517_eCFP_f und 517_eCFP_r. *ecfp* wurde mit *NdeI* und *EcoRI* upstream von *dctA* gelegen in pMW1837 kloniert, wodurch pMW1838 entstand. Es folgte eine gerichtete Mutagenese mit den Primern 1838_SpeI_f und 1838_SpeI_r um zwischen *ecfp* und *dctA* drei Basenpaare und die Schnittstelle *SpeI* einzufügen. Das *his₆-ecfp-dctA*-Konstrukt wurde mit den Primer eCFP-dctA_f und eCFP-dctA_r mit der Ribosomenbindestelle amplifiziert und über *XbaI* und *HindIII* in pBAD18k* inkloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *EcoRI* geschnitten und zwischen *ecfp* und *dctA* ein Linker eingefügt, der aus den hybridisierten Oligonukleotiden Linker_SpeI_EcoRI_f und Linker_SpeI_EcoRI_r bestand. Die Oligonukleotide waren 5'-phosphoryliert, um eine

Ligation in das Plasmid zu ermöglichen. Der Linker enthielt eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease (ENLYFQG) und sorgte für einen ausreichenden Abstand der eCFP und DctA Proteine. Durch eine gerichtete Mutagenese mit den Primer A206K_ecfp_f und A206K_ecfp_r erfolgte der Austausch von Alanin gegen Lysin, um eine Homodimerisierung des eCFP-Proteins zu verhindern (Zacharias *et al.* 2002).

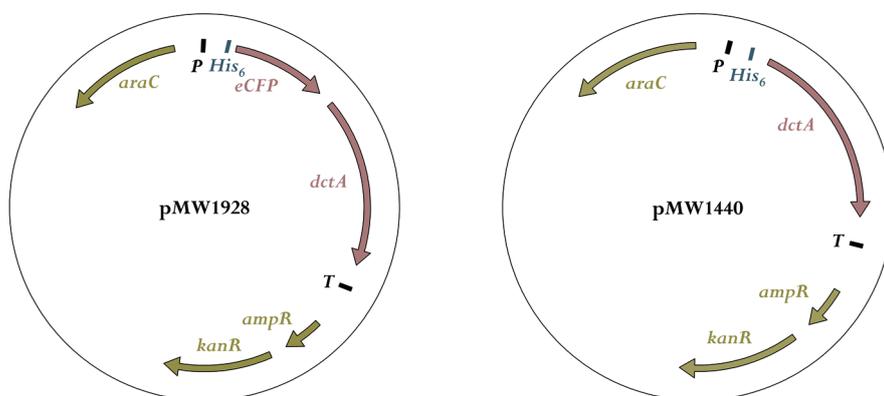


Abb. 04: Die Plasmide pMW1928(His₆-eCFP-L-DctA) und pMW1440(His₆-DctA) für die regulierbare Überproduktion von DctA. Die Plasmide pMW1928 und pMW1440 sind von pBAD18k deriviert und besitzen eine Resistenzkassette für Kanamycin. Die Expression der klonierten Gene unterliegt der Regulation des pBAD Promoters, welcher durch Glukose gehemmt wird. Durch steigende Konzentrationen von L-Arabinose kann die Expression in regulierter Form abgeschaltet werden.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Überproduktion und Isolation von His₆-DctA und His₆-eCFP-L-DctA

Überproduktion

Für die Überproduktion von His₆-DctA (pMW1440) und His₆-eCFP-L-DctA (pMW1928) wurde der Stamm C43(DE3) verwendet, da er auf die Überproduktion von Membranproteinen relativ unempfindlich reagiert (Miroux und Walker 1996). Die

Vorkulturen wurden mit isolierten Klonen angeimpft, die jeweils frisch transformiert wurden. Die Kulturen wurden in 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum gezüchtet und wuchsen über Nacht bei 30 °C in Schikanekolben (EXCELLA E24; New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Je Überproduktion wurden 4x 400 ml Hauptkulturen 4%ig beimpft, die in 2 l Schikanekolben mit LB-Medium bei 30 °C wuchsen (Model G25; New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Bei einer OD_{578} 0,5 - 0,6 wurde mit 600 μ M L-Arabinose induziert, da das pBAD18k derivierte Plasmid unter der Kontrolle des P_{BAD} -Promoters steht. Nach 3 h wurden die Zellen pelletiert (6000 UpM / 4 °C / 10 Min / Rotor JA-10 / J2MC; Beckmann Coulter, Brea, CA, USA) und je Ansatz mit 25 ml gekühltem Puffer A gewaschen. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeitsschritte auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt und die Puffer entsprechend gekühlt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Pellet über Nacht bei -80 °C gelagert.

Zellaufschluss und Extraktion der Membranproteine aus der Membranfraktion

Die Zellpellets wurden in Puffer A mit einem Glasstab resuspendiert und in drei Durchgängen in der French Press aufgeschlossen (FA078E1; Aminco). Nachdem die Suspension deutlich aufklarte, wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer mittels Zentrifugation entfernt (10k UpM / 15 min / 4 °C / Rotor 16F6-38 / Kühl-Zentrifuge 5403; Eppendorf, Hamburg). Der erhaltene Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und die Zellmembran durch Ultrazentrifugation gewonnen (45k UpM / 75 min / 4 °C / Rotor TFT 70.38 / Optima LE-80K Ultrazentrifuge; Beckmann Coulter, Brea, CA, USA). Der Überstand wurde entfernt und stellt die lösliche Proteinfraction dar. Die Membranpellets wurden mit Puffer A überschichtet und erneut zentrifugiert (45k UpM / 45 min / 4 °C / Rotor TFT 70.38 / Optima LE-80K Ultrazentrifuge; Beckmann Coulter, Brea, CA, USA). Die erhaltenen Pellets wurden mit einem Spatel entnommen und mit dem Potter S (Braun, Melsungen) homogenisiert. Je g Membran wurden 10 ml Puffer B zugegeben. Membransuspensionen die mit dem gleichen Detergenz behandelt wurden,

wurden ab diesem Zeitpunkt zusammengeführt. Die homogenisierten Membranen wurden für 1 h langsam auf Eis gerührt und Detergenzien (Tabelle 07) zugesetzt. Wurde DctA nachfolgend rekonstituiert und für Phosphorylierungs-Experimente eingesetzt, so wurde Fos-Cholin-12 mit einer Endkonzentration von 1 % (w/v) verwendet. Die solubilisierten Membranproteine wurden erneut ultrazentrifugiert um restliche Bestandteile der Membran zu separieren (45k UpM / 75 min / 4 °C / Rotor TFT 70.38 / Optima LE-80K Ultrazentrifuge; Beckmann Coulter, Brea, CA, USA). Der Überstand wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und über Nacht bei -80 °C gelagert.

Tabelle 07: In dieser Arbeit verwendete Detergenzien zur Extraktion von His₆-eCFP-L-DctA aus der Membranfraktion. CMC = Critical micelle concentration = Konzentration ab der sich Mizellen bilden. DDM = n-Dodecyl-β-D-maltosid, LDAO = N,N-Dimethyl-n-dodecylamine N-oxide, FC-12 = Fos-Cholin-12, N-Malt = n-Nonyl-β-D-maltosid, U-Malt = n-Undecyl-β-D-maltosid, DMNG = n-Decyl-β-D-maltopyranosid, OGNG = Octyl Glucose Neopentyl Glycol

Detergenz	Triton X-100	DDM	N-Malt	U-Malt	DMNG
CMC (mM)	0,9	0,15	6	0,59	0,036
Molekulargewicht	625	510	468	496	949
Kopfgruppe	nicht-ionisch	nicht-ionisch	nicht-ionisch	nicht-ionisch	nicht-ionisch

Detergenz	OGNG	Empigen BB	LDAO	FC-12
CMC (mM)	1,02	2,1	2	1,5
Molekulargewicht	568	279	230	351
Kopfgruppe	nicht-ionisch	zwitter-ionisch	zwitter-ionisch	zwitter-ionisch

Isolation über Affinitätschromatografie (Ni²⁺-NTA Agarose)

Die solubilisierten Membranproteine wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und danach auf Eis gelagert. In eine verschließbare Säule (Econo-Pac® Chromatography Column, Biorad,

Hercules, CA, USA) wurden 5 ml Ni²⁺-NTA-Agarose-Suspension (Ni-NTA Superflow, Qiagen, Hilden) gegeben, was 2,5 ml Ni²⁺-NTA-Agarose entspricht (Bindekapazität von 250 mg Protein). Alle weiteren Schritte wurden in einem auf 4 °C temperierten Arbeitsraum durchgeführt und die verwendeten Puffer gekühlt. Lösungen wurden mit einer Pipette auf die Säule gegeben, um das Agarosesubstrat nicht aufzuwühlen. Die Agarose wurde mit 10 ml Bindepuffer (10 mM Imidazol) gespült und die solubilisierten Membranproteine auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und auf eine zweite Säule gegeben. Die Säule wurde mit 2x 10 ml Waschpuffer (30 mM Imidazol) gewaschen. Das Protein wurde mit insgesamt 2,5 ml Elutionspuffer (500 mM Imidazol) eluiert und in Eppendorf-Gefäße auf Eis eluiert. Die letzten beiden Fraktionen hatten ein Volumen von 0,5 ml, Fraktionen 2-4 enthielten 1 ml. Das eluierte Protein wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Bestimmung der Proteinkonzentration und Dialyse

Sowohl die verwendeten Detergenzien als auch die im Elutionspuffer eingesetzte Menge an Imidazol stören diverse Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Deshalb wurde der Protein-Gehalt der Eluate auf einem SDS-PAGE Gel qualitativ überprüft. Die Fraktionen mit einer hohen Reinheit und Proteinkonzentration wurden zusammengeführt und gegen den Elutionspuffer ohne Imidazol dialysiert. Die Dialyseschläuche (Zellutrans, MWCO 8000 - 10000, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden für 10 min in 2 % (w/v) NaHCO₃ und 1 mM Na₂-EDTA (pH 8) aufgekocht und dann im Kühlschrank gelagert. Die Proteinproben wurden zweimal bei 4 °C für 2 h gegen des hundertfache Volumen dialysiert. Die Proteine wurden ein drittes Mal über Nacht dialysiert. Die Proteinkonzentration in den dialysierten Protein-Isolationen wurde mit dem Bradford-Test (Roti®-Quant, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bestimmt. Die Eichgerade wurde gemessen, in dem definierte Mengen an BSA in Elutionspuffer mit entsprechendem Detergenz gelöst wurde. Die Eichgerade deckte den Bereich von 20 µg/ml - 2000 µg/ml ab. Vor Durchführung des Tests wurde die

Roti®-Quant-Lösung auf Raumtemperatur gebracht. In einer 96-Well-Deep-Well-Platte wurden 780 µl aqua dest. mit 20 µl Probe vermischt, die bei Bedarf mit Elutionspuffer verdünnt wurde. Es wurden 200 µl Roti®-Quant zugegeben und mit einer Mehrkanalpipette mehrmals gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 22 °C wurden nach erneutem Mischen jeweils 200 µl Probe in eine 96-Well Mikrotiterplatte überführt. Die Messung der Extinktion erfolgte in einem MTP-Reader (EL808, Biotek; Winooski, VT, USA) bei 570 nm. Für jede Probe wurde eine dreifache Bestimmung durchgeführt.

3.6.2 Überproduktion und Isolation von His₆-DcuS

Die Überproduktion und Isolation von His₆-DcuS nach etablierten Protokollen durchgeführt (Janausch *et al.* 2002B; Kneuper *et al.* 2005; Scheu *et al.* 2010B). Die Überproduktion erfolgte größtenteils analog zu der von DctA. His₆-DcuS wurde über das Plasmid pMW151 in C43(DE3) überproduziert. Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG. Nach Separation der Membranfraktion wurden die Membranproteine mit 2 % (v/v) Empigen BB extrahiert. Während der Reinigung auf der Ni²⁺-NTA-Säule erfolgte ein Detergenzwechsel zu LDAO (0,1 % (v/v)). Alle weiteren Schritte entsprechen dem Protokoll für die DctA-Überproduktion.

3.6.3 Rekonstitution von His₆-DcuS und His₆-eCFP-L-DctA in Liposomen

Die Rekonstitution von His₆-DcuS und His₆-eCFP-L-DctA wurde analog zu den Protokollen für His₆-DcuS durchgeführt (Janausch *et al.* 2002B; Kneuper *et al.* 2005; Scheu *et al.* 2010B). Die Lipid-Vesikel wurden aus *E. coli* Phospholipiden (*E. coli* Polar Lipid Extract) hergestellt. Es wurden 100 mg der in Chloroform gelösten Phospholipide (20 mg/ml) im Rotationsdampfer getrocknet und in 5 ml Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 8) mit 55 mM n-Octyl-β-D-Glucopyranosid aufgenommen. Damit sich aus den in Detergenz gelösten Phospholipiden Lipid-Vesikel bilden, wurde die Lösung drei Mal gegen 1 l

Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 8) bei 4 °C dialysiert und das Detergenz entfernt. Um aus den multilaminaren Lipid-Vesikeln unilaminare zu erhalten, wurden diese drei Mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Lipid-Vesikel wurden mit 52 mM Triton X-100 vollkommen destabilisiert, wobei ein Detergenz:Lipid Verhältnis von 2,5 eingehalten wurde (Rigaud *et al.* 1988, 1995). Für die Berechnung der Detergenzkonzentration wurde die Formel nach Paternostre 1988 verwendet:

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

D_t = Detergenzkonzentration

D_a = Konzentration des Detergenz in der wässrigen Phase (Triton X-100: 0,18 mM)

$R_{\text{eff}}[\text{Lipid}]$ = Detergenz:Lipid Verhältnis

Isoliertes His₆-DcuS und His₆-eCFP-L-DctA in Elutionspuffer (ohne Imidazol) wurde zu den Lipid-Vesikeln gegeben und für 15 min bei 22 °C auf dem Taumelschüttler inkubiert. Dabei wurde His₆-DcuS in einem Protein:Lipid Verhältnis von 1:29 (w/w) eingesetzt und His₆-eCFP-L-DctA im Verhältnis 1:10 (w/w). Triton X-100 wurde mittels Bio-Beads™ (Holloway *et al.* 1973) (SM-2 Resin, Bio-rad, Hercules, CA, USA) bei 4 °C langsam entfernt, um die Bildung von dichten Lipid-Vesikeln zu gewährleisten und die Membranproteine in diese einzubauen. Die Bio-Beads™ wurden in einem Sovirel-Röhrchen mit Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 8) überschichtet und während dem Anaerobisieren mit einem Magnetrührer und einem Rührfisch gerührt, bis kein Gas mehr austrat. Die Bio-Beads™ wurden in 5-fachem Überschuss (w/w) zu Triton X-100 verwendet und die Lipid-Vesikel in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß für 2 h bei 4 °C auf einem Taumelschüttler inkubiert. Anschließend wurde erneut ein 5-facher Überschuss an Bio-Beads™ (w/w) zugegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelschüttler inkubiert. Nach der dritten Zugabe der gleichen Menge an Bio-Beads™ wurde das Eppendorf-Gefäß

für 1 h bei 22 °C geschüttelt. Die Überführung in Ultrazentrifugen-geeignete 1,5 ml Gefäße (Microfuge Polyallomer; Beckmann Coulter, Brea, CA, USA) erfolgte mit 20 - 200 µl Pipettenspitzen, um die Bio-Beads™ abzutrennen. Nicht-rekonstituiertes Protein wurde durch Ultrazentrifugation (45k UpM / 75 min / 4 °C / Rotor TFT 70.38 / Optima LE-80K Ultrazentrifuge; Beckmann Coulter, Brea, CA, USA) in entsprechenden 1,5 ml Gefäßen separiert. Der Überstand wurde mit einer 1 ml Spritze (Hamilton, Höchst im Odenwald) abgezogen und verworfen. Die pelletierten Lipid-Vesikel wurden in Puffer R (50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8, 10 % Glycerin, 200 mM NaCl, 1 mM DTT) aufgenommen (Lipid Konzentration = 20 mg/ml) und in 500 µl aliquotiert. Es folgten drei Zyklen, in denen die Lipid-Vesikel mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Die Lipid-Vesikel wurden sofort verwendet oder bei -80 °C gelagert.

3.6.4 Phosphorylierung von rekonstituiertem His₆-DcuS

Die Phosphorylierung von His₆-DcuS wurde analog zu etablierten Protokollen durchgeführt (Janausch *et al.* 2002B; Kneuper *et al.* 2005). Rekonstituiertes Protein wurde bei 4 °C aufgetaut und MgCl₂ (5 mM) als Ko-Faktor für DcuS und bei Bedarf Na₂-Fumarat (20 mM) als Effektor zugegeben. Die Proben wurden in drei Zyklen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut, um die Lipid-Vesikel durchlässig zu machen und eine homogene Stoffverteilung innerhalb und außerhalb der Vesikel zu schaffen. Danach folgte die Inkubation bei 22 °C für 1 h, um eine Rückassemblierung der Phospholipide zu gewährleisten. Die Phosphorylierungsreaktion wurde mit der Zugabe von [γ -³³P]ATP (111 TBq/mmol) oder entsprechenden Verdünnungen mit kaltem ATP gestartet. Die Proben wurden auf einem kühlbaren, temperierten Wasserbad bei 25 °C inkubiert. Zu definierten Zeiten wurden Proben entnommen, die den angegebenen Mengen an DcuS entsprachen. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 10x SDS-Auftragspuffer gestoppt und die Proben bis zur Durchführung der SDS-PAGE auf Eis gehalten. Wurde

die β -Strahlung von DcuS mit dem Phosphoimager (FLA-7000; Fuji Film, Tokio, Japan) gemessen, so wurde das Polyacrylamid-Gel für 18 h bei 4 °C auf die Phosphoimager Platte (BAS 2040; Fuji Film, Tokio, Japan) gelegt. Die Messung der relativen Strahlung geschah über das Programm Gel-Pro Analyzer 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Wurde die Radioaktivität von DcuS über den Szintillationszähler (Wallac 1414; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) bestimmt, so wurde das Polyacrylamid-gel für 30 min mit Coomassie gefärbt. Das Gel wurde in mehreren Schritten bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler mit Entfärbelösung (10 % (v/v) Eisessig, 10 % (v/v) Ethanol) entfärbt, bis Proteinbanden erkennbar waren. Die DcuS-Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und zerkleinert. Um den Blindwert zu ermitteln, wurde ein Gelstück unterhalb der DcuS-Bande ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden für 15 h mit 500 μ l H₂O₂ (30 %) bei 50 °C in Szintillationsvials (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gelöst und danach 4 ml Szintillationslösung (Rotiszint eco plus; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) zugegeben. Der Anteil an phosphoryliertem DcuS wurde über die eingesetzte Menge an Protein und der spezifische Aktivität der [γ -³³P]ATP-Lösung berechnet.

3.6.5 SDS-PAGE und semi-dry Western-blotting

SDS-PAGE und Fluoreszenzmessung im Gel

Für die SDS-PAGE wurden 12,5 %ige Gele und ein 10x Proben-Auftragspuffer verwendet. Die Elektrophorese wurde im Mini-Protean System von Bio-rad, Hercules, CA, USA durchgeführt und lief bei einer konstanten Spannung von 250 V für ca. 50 min. Um die Fluoreszenz des His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukts im SDS-Gel zu messen, wurde das Gel vor der Färbung mit Coomassie im Stella 3000 (Raytest, Straubenhardt) bei 437 nm angeregt und digitalisiert.

Semi-dry Western-blotting und Immunblot

Western-blotting wurde mit dem Pierce Fast Semi-Dry Blotter (Thermo Fisher Scientific Biosciences, St. Leon-Rot) durchgeführt. Von der Kathode ausgehend wurden 2 Lagen Chromatographiekarton (2043B; Schleicher & Schüll, Düren), die Membran aus Nitrocellulose (BA85 0,45 µm; Schleicher & Schüll, Düren) und weitere zwei Lagen Chromatographiekarton als Sandwich geschichtet. Alle Komponenten wurden zuvor für ca. 1 min in Western Blot Transfer Puffer gelegt und hatten eine Abmessung von 8 cm x 6,5 cm. Um einen gleichmäßigen Proteintransfer zu gewährleisten, wurden Luftblasen mit einem Reagenzglas aus dem Sandwich gerollt. Es wurde eine Konstante Stromstärke angelegt, die nach folgender Formel berechnet wurde:

$$I[\text{mA}] = \text{Fläche Membran} [\text{cm}^2] \times 1,6$$

Die Proteine wurden für ca. 50 min geblottet. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur in Blockingpuffer inkubiert und auf einen Taumelschüttler gelegt. Nachdem die Membran mit Protein gesättigt war, wurde sie mit dem primären Antikörper behandelt. Die Membran wurde ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler inkubiert. Es folgten drei Waschschrte in Waschpuffer für jeweils 5 min auf dem Taumelschüttler. Der sekundäre Antikörper wurde ebenso wie der primäre appliziert und die Membran dreimal gewaschen. Die Membran wurde mit einem Zellstofftuch vorsichtig abgetupft und mit 600 µl Chemilumineszenz-Substrat (Immobilon Western HRP Substrat; Merck Millipore, Darmstadt) bedeckt. Die Membran wurde zwischen zwei Folien gelegt, um das Substrat gleichmäßig zu verteilen und etwaige Luftblasen zu entfernen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden überschüssiges Substrat abgetupft und die Membran in einer Entwicklerkassette fixiert. Ein Röntgenfilm (LucentBlue X-ray film; Advansta, Menlo Park, CA, USA) wurde aufgelegt und für 30 s bis 5 min belichtet. Die Entwicklung erfolgte im SRX101A von Konica Minolta, Marunouchi, Japan.

3.6.6 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität

Die β -Galaktosidase Aktivität wurde in *dcuB-lacZ* Expressionsstudien quantifiziert, um Rückschlüsse auf die Aktivierung des DcuSR Systems zu schließen. Die Methode wurden nach Miller (1992) durchgeführt. Hierbei wurde das Substrat ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid) eingesetzt, welches durch β -Galaktosidase in Galactose und ortho-Nitrophenol gespalten wird. Ortho-Nitrophenol wird bei 415 nm photometrisch nachgewiesen. Die Messung der Aktivität erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Griffith und Wolf (2002), welches in Monzel *et al.* (2013) beschrieben wurde. Die Kulturen wuchsen in 96-Deep-Well-Platten. Um die Zelldichte zu bestimmen, wurden 250 μ l Kultur in einer 96-well Mikrotiter Platte (MTP) überführt und die OD₅₇₀ im MTP-Reader (EL808; Biotek, Winooski, VT, USA) gemessen. Der Zellaufschluss wurde in einer Deep-Well Platte durchgeführt, in dem 200 μ l Kultur mit 800 μ l β -Galaktosidase-Puffer, 50 μ l CTAB (0,1 %) und 25 μ l SDS (0,1 %) durch die Mischfunktion (30x) einer Mehrkanal-Pipette (E4 XLS Rainin; Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA) vermengt wurden. Aus jedem Well wurden vier Aliquots zu 150 μ l entnommen und in MTPs überführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 μ l ONPG (4 mg/ml) je Well gestartet, nachdem die MTPs für 5 min bei 30 °C vorgewärmt wurden. Die Platten wurden für 20 min bei 30 °C inkubiert und die Reaktion mit 70 μ l Na₂CO₃ (1 M) gestoppt. Die Exktinktion bei 415 nm wurde mit dem MTP-Reader bestimmt. Die Berechnung der β -Galaktosidase-Aktivität in Miller Units (MU) erfolgte nach folgender Formel:

$$\beta - \text{Galaktosidase Aktivität [MU]} = \frac{1000 \times \Delta E_{415}}{t[\text{min}] \times V[\text{ml}] \times \Delta OD_{570}}$$

ΔE_{415} : Extinktion der Probe bei 415 nm abzüglich des Blindwerts. **t[*min*]**: Dauer bis zum Reaktionsstopp. **V[*ml*]**: Probenvolumen. **ΔOD_{570}** : Optische Dichte der Kultur abzüglich der des unbewachsenen Mediums.

3.6.7 Transportmessung mit [2,3-¹⁴C]-Fumarat

Die Kulturen für die Transportmessung wuchsen aerob in LB-Medium und wurden bei einer OD₅₇₈ von 1,0 - 1,3 geerntet (8000 UpM / 20 min / 4 °C / Rotor 16F6-38 / Kühl-Zentrifuge 5403; Eppendorf, Hamburg). Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen auf Eis gehalten und die verwendeten Puffer waren auf 4 °C gekühlt. Die resultierenden Zellpellets wurden mit Transportpuffer gewaschen und wurden danach mit dem Puffer auf eine OD₅₇₈ 5 eingestellt. Von der Zellsuspension wurden 640 µl zu 160 µl [2,3-¹⁴C]-Fumarat (100 µM, 250 µM, 500 µM) gegeben, gevortext und bei 37 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 100 µl Zellsuspension entnommen, mit 900 µl LiCl (0,1M) gestoppt und auf einen Glasfaserfilter (APFF, Ø25 mm, Porengröße 0,7 µm; Merck Millipore, Darmstadt) übertragen, die zuvor mit LiCl (0,1 M) befeuchtet wurden. Um überschüssiges [2,3-¹⁴C]-Fumarat abzuwaschen, wurden zweimal 1 ml LiCl (0,1 M) auf den Filter gegeben und über ein Vakuum durch den Filter gezogen (FH 225V Ten Place filter manifold; Hoefer Pharmacia Biotech, Holliston, MA, USA). Die Filter wurden in Szintillationsvials (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) überführt und in 4 ml Szintillationslösung (Rotiszint eco plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) aufgelöst. Die Messung erfolgte im Szintillationszähler Wallac 1414; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA.

Berechnung der Transportaktivität

Die Radioaktivität der Zellen wurde mit einem Szintillationszähler (Wallac 1414; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) in Zählschritten pro Minute (cpm) gemessen. Um den Blindwert zu bestimmen, wurden die Zellen direkt mit LiCl (0,1 M) versetzt und anschließend [2,3-¹⁴C]-Fumarat zugegeben. Die Berechnung der Aufnahmeaktivität wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Aufnahmeaktivität} \left[\frac{U}{gTG} \right] = \frac{\Delta dpm \times 10000}{\frac{dpm}{nmol} \times t[\text{min}] \times 281 \text{ mgTG} \times \Delta OD_{578}}$$

Δdpm: Radioaktivität der Probe nach Abzug des Blindwerts. **dpm/nmol:** Spezifische Radioaktivität von [2,3-¹⁴C]-Fumarat. **t[**min**]:** Zeit bis zum stoppen der Aufnahme. **ΔOD₅₇₈:** Differenz von OD₅₇₈ der Kultur und des unbewachsenen Mediums; OD₅₇₈ 1 entspricht einem Zelltrockengewicht (TG) von 281 mg (Zientz *et al.* 1996).

3.7 Bioinformatik

3.7.1 Molekulares Docking

Als Rezeptor wurde die von Cheung und Hendrickson (2008) aufgeklärte Struktur von DcuS-PAS_p verwendet, welche in der RCSB *Protein Data Bank* unter der Kennung 3BY8 hinterlegt ist. Gebundenes L-Malat wurde aus der Struktur entfernt und Informationen über partielle Ladungen (Gasteiger Ladungen) mit den Auto Dock Tools zugefügt. Den Liganden (C₄-Dicarboxylate in dianionischer Form) wurden partielle Ladungen (Gasteiger Ladungen) und Torsionsinformationen mit den Auto Dock Tools zugefügt. In der Rezeptor Struktur wurde ein würfelförmiger Suchbereich mit einer Kantenlänge von 16 Å festgelegt, dessen Mittelpunkt an der Stelle des gebundenen L-Malat-Moleküls lokalisiert war. Innerhalb des Würfels berechnete das Programm Auto Dock Tools mögliche Koordinationen der Liganden durch den Rezeptor. Da Wasserstoffbrücken über eine Distanz von 2,6 bis 3,1 Å ausgebildet werden, wurde innerhalb von 3,1 Å nach polaren Kontakten gesucht und diese mit der wahrscheinlichsten Koordination der Liganden in der Software PyMOL 1.3 visualisiert.

3.7.2 Software und Webseiten

Clone Manager 5.0; Sci-Ed Software, Denver, CO, USA.

http://www.scienced.com/pr_cmpro.htm

Gel-Pro Analyzer 6.0; Media Cybernetics, Rockville, MD, USA.

<http://www.mediacy.com/index.aspx?page=GelPro>

PyMOL 1.7, Schrödinger

<https://www.pymol.org/>

MGL-Tools; The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA.

<http://mgltools.scripps.edu/>

EasyConvert; Biochem Lab Solutions, University of California, San Francisco, USA.

<http://biochemlabsolutions.com/Molecule%20Docking/FORMATS/Formats%20PDB%20PDBQT%20SDF%20MOL.html>

Auto Dock Tools (Morris *et al.* 2009)

<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>

Autodock Vina (Trott *et al.* 2010)

<http://vina.scripps.edu/>

Datenbanken

NCBI

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

EcoGene (Zhou und Rudd 2013)

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

Uniprot (UniProt Consortium 2014)

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

RCSB Protein Data Bank (Berman *et al.* 2000)

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Sequenzvergleiche

EMBOSS Needle (Rice *et al.* 2000)

http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/

Clustal Omega (Sievers *et al.* 2011; Goujon *et al.* 2010)

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

NCBI BLAST (Boratyn *et al.* 2013)

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

Weitere Werkzeuge

OligoCalc (Kibbe 2007)

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

ExPASy (Gaststeiger *et al.* 2003)

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

4 Ergebnisse

Das Zweikomponentensystem DcuSR besteht aus der Sensorkinase DcuS und dem Responseregulator DcuR. In *Escherichia coli* reguliert DcuSR den C₄-Dicarbonsäure Stoffwechsel. Bindet DcuS ein Substrat, kommt es zu einer Transautophosphorylierung der Kinasedomäne innerhalb eines DcuS-Dimers. Der Phosphatrest wird auf DcuR übertragen, wodurch der Responseregulator in seine aktive Form überführt wird. Unter aeroben Bedingungen werden C₄-Dicarbonsäuren vor allem durch den Symporter DctA in die Zelle transportiert. Nach dem aktuellen Modell bilden DcuS und DctA (unter anaeroben Bedingungen DcuS und DcuB) einen Sensorkomplex (Witan *et al.* 2012; Steinmetz *et al.* 2014; Uden *et al.* 2016). DcuS übernimmt die Sensorfunktion und wird durch die Interaktion mit DctA oder DcuB in den für Substrate responsiven Zustand versetzt (Steinmetz *et al.* 2014; Wörner *et al.* 2016; Uden *et al.* 2016). Um die Abhängigkeit der DcuS-Aktivität von der Interaktion zwischen DcuS und DctA isoliert unter definierten Bedingungen betrachten zu können, wurden DcuS und DctA überproduziert und in künstliche Membranen rekonstituiert. Während die Überproduktion von DcuS nach etablierten Methoden durchgeführt wurde (Janausch *et al.* 2002B; Kneuper *et al.* 2005; Scheu *et al.* 2010B), wurde die Überproduktion und Isolierung von DctA optimiert. Hierbei wurde auf Untersuchungen von Zeltner (2012) aufgebaut.

4.1 Optimierung der Präparation von DctA

4.1.1 Überproduktion von His₆-DctA

Zeltner (2012) hat die optimalen Parameter für die Überproduktion von His₆-DctA ermittelt. Um DctA per Affinitätschromatographie über eine Ni²⁺-NTA-Säule zu isolieren, wurde das Protein am N-terminalen Ende mit einem Hexahistidin-Tag fusioniert

(Abb. 05A). Für die Überproduktion des DctA-Konstrukts wurde ein Derivat des pBAD18k Vektors verwendet (pMW1440), dessen Expressionslevel über die Konzentration des Induktors L-Arabinose regulierbar war (Guzman *et al.* 1995). Es wurde der Einfluss des Induktionszeitpunkts, der Konzentration des Induktors, der Induktionsdauer und der Inkubationstemperatur untersucht. Schärferer Waschpuffer mit niedrigem pH-Wert und höherer Imidazol-Konzentration auf der Ni²⁺-NTA-Säule hatten keinen Einfluss auf die Reinheit der Präparationen. Die ermittelten, optimalen Parameter, wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

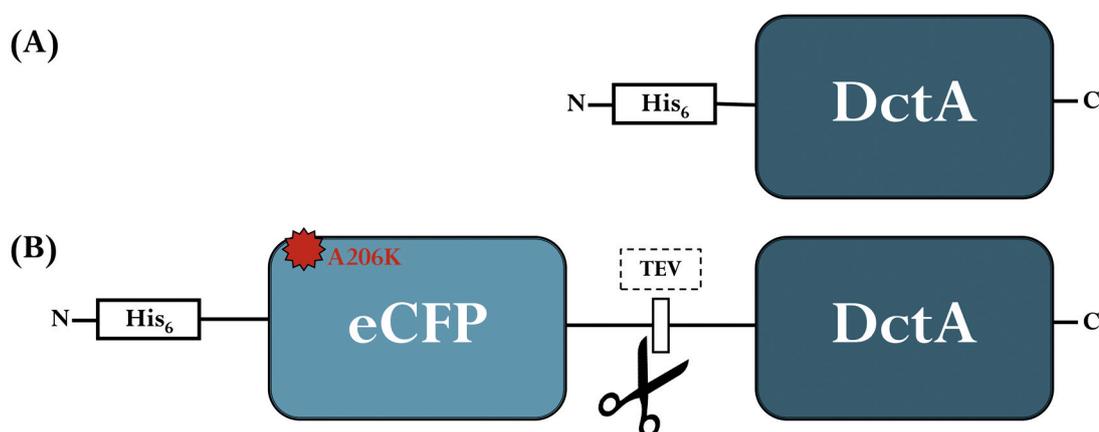


Abb. 05: DctA-Konstrukte für die Überproduktion. (A) DctA wurde N-terminal mit einem His₆-Tag fusioniert, um das Protein per Affinitätschromatographie zu isolieren. (B) DctA wurde N-terminal mit eCFP fusioniert, welches die Löslichkeit von DctA steigern und als Nachweis für den Faltungszustand von überproduziertem DctA dienen sollte. N-Terminal befindet sich ein His₆-Tag, um das Konstrukt per Affinitätschromatographie zu isolieren. Zwischen eCFP und DctA wurde ein 36 AA langer Linker eingebaut, der eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease besitzt. In eCFP wurde die Mutation A206K eingeführt, welche die Homoaffinität zwischen eCFP-Monomeren reduziert (Zacharias *et al.* 2002).

Für die Überproduktion von His₆-DctA wurde der Expressionsstamm *E. coli* C43(DE3) mit dem Plasmid pMW1440 (His₆-DctA) transformiert. Bei einer OD₅₇₈ von 0,5 wurde mit L-Arabinose induziert. Der Zellaufschluss erfolgte mit der French Press. Die Membranproteine wurden mit Detergenzien (Tabelle 08) aus der Membranfraktion

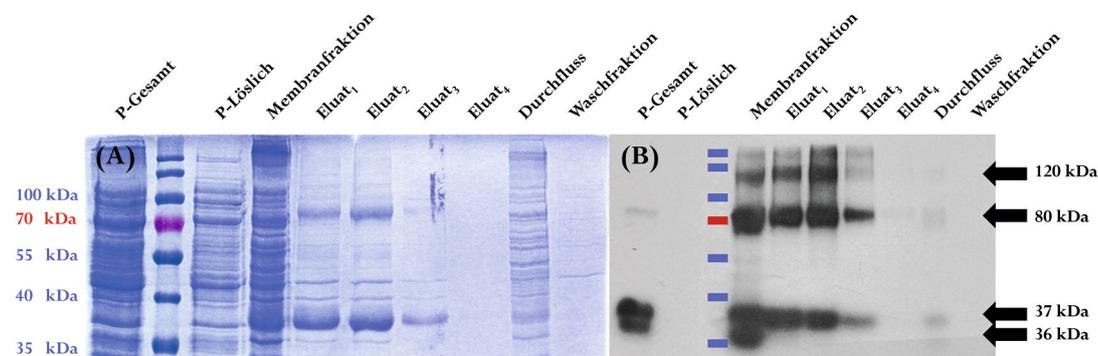


Abb. 06: Überproduktion und Isolierung von His₆-DctA. (A) P-Gesamt = Gesamtprotein = 66 µg, P-Löslich = Lösliches Protein = 22 µg, Membranfraktion = 53 µg. Es wurden jeweils 20 µl Eluat aufgetragen. (B) Nachweis von His₆-DctA über Anti-His₆-Antikörper. Proben wie (A).

extrahiert und das Konstrukt per Affinitätschromatographie isoliert. Die Fraktionen mit dem höchsten His₆-DctA-Gehalt und großer Reinheit wurden durch SDS-PAGE qualitativ ermittelt (Abb. 06A).

In Abb. 06A ist die Überproduktion und Isolierung von His₆-DctA auf einem SDS-Gel gezeigt. Die Proben wurden analog mit der Western Blot-Methode behandelt und mit Anti-His₆-Antikörpern inkubiert (Abb. 06B). Bis ca. 140 °C werden hydrophobe Bindungseffekte durch höhere Temperaturen verstärkt (Schellman 1997), weshalb die Proteinproben vor der SDS-PAGE nicht aufgekocht, sondern direkt mit SDS-Auftragspuffer versetzt und auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurden. Ein Aufkochen der His₆-DctA-Proben führte zu einem verstärkten Auftreten von oligomerem DctA bzw. unspezifischen Aggregaten während der SDS-PAGE (nicht gezeigt). Auf dem Immunblot trat in den Spuren mit Gesamtprotein, der Membranfraktion und mit isoliertem His₆-DctA bei 37 kDa ein Signal auf. Im SDS-Gel war bei 37 kDa ebenfalls eine prominente Bande sichtbar. Das His₆-DctA-Konstrukt (Monomer) hat eine molekulare Masse von 46 kDa, zeigt im SDS-PAGE Gel aber eine niedrigere apparente Masse (Geertsma *et al.* 2008; Zeltner 2012; Witan 2012). In den Spuren des Gesamtproteins und der Membranfraktion war auf dem Immunblot und dem

gefärbten SDS-Gel bei 36 kDa eine zweite Bande erkennbar. In den Spuren mit isoliertem Protein zeigten sich im SDS-Gel relativ schwache Banden. Da His₆-DctA ein duales Laufverhalten aufweist, handelt es sich dabei wahrscheinlich ebenfalls um monomeres His₆-DctA (Geertsma *et al.* 2008; Zeltner 2012; Witan 2012). In Geertsma *et al.* (2008) wurde gezeigt, dass nur die untere Bande nativ gefaltetes Protein repräsentiert. Auf dem Immunblot wurden bei 80 kDa und 120 kDa reaktive Banden nachgewiesen. Im Gesamtprotein trat das Signal bei 120 kDa nicht auf, die Bande bei 80 kDa war relativ schwach erkennbar. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um oligomeres His₆-DctA. In späteren Stufen der His₆-DctA-Isolierung kam es zu einer relativen Zunahme der Banden bei 80 kDa, 120 kDa und 37 kDa. Während His₆-DctA in den Fraktionen mit Gesamtprotein und der Membran ein duales Laufverhalten zeigte, so trat in den Fraktionen mit isoliertem Protein die Bande bei 37 kDa gegenüber der 36 kDa stark in den Vordergrund. Die Zunahme an oligomerem (80 kDa, 120 kDa) und dysfunktionalem His₆-DctA (37 kDa) deuten darauf hin, dass His₆-DctA im Verlauf der Isolation zunehmend aggregiert und in eine dysfunktionale Form übergeht.

4.1.2 Optimierung der Extraktion von His₆-DctA aus der Membran

Mit dem Ziel, die Reinheit und Ausbeute von funktionalem His₆-DctA zu steigern, wurden separierte Zellmembranen mit unterschiedlichen Detergenzien behandelt. Detergenzien werden bei der Extraktion von Membranproteinen aus der Membran eingesetzt und bringen diese in Lösung. In Zeltner (2012) wurden die Detergenzien Triton X-100, Empigen BB, n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) und N,N-Dimethyl-n-dodecylamine N-oxide (LDAO) getestet. Die Effizienz der Detergenzien in Bezug auf Reinheit und Ausbeute von His₆-DctA wurde in dieser Arbeit mit denen von Fos-Cholin-12, n-Nonyl- β -D-maltosid (Nonyl-Maltosid) und n-Undecyl- β -D-maltosid (Undecyl-Maltosid) verglichen.

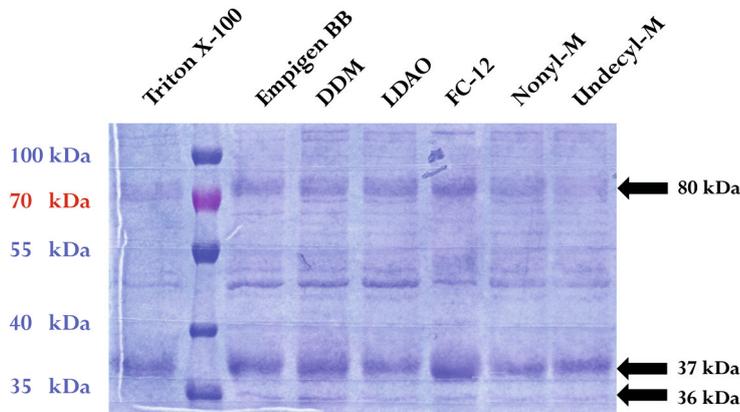


Abb. 07: Effizienz der Detergenzien in der Extraktion von His₆-DctA aus der Membran. Es wurden jeweils 8,7 µg Protein aus Elutionsfraktionen aufgetragen. 36 kDa Bande = funktionales, monomeres His₆-DctA, 37 kDa Bande = dysfunktionales, monomeres His₆-DctA, 80 kDa Bande = Oligomeres His₆-DctA. DDM = n-Dodecyl-β-D-maltosid, LDAO = N,N-Dimethyl-n-dodecylamine N-oxide, FC-12 = Fos-Cholin-12, Nonyl-M = n-Nonyl-β-D-maltosid, Undecyl-M = n-Undecyl-β-D-maltosid.

Die Detergenzien wurden entsprechend Tabelle 07 in Material und Methode eingesetzt. Es wurden sowohl nicht-ionische als auch zwitter-ionische Detergenzien verwendet. Nicht-ionische Detergenzien werden gegenüber zwitter-ionischen Detergenzien als mild bezeichnet. Sie extrahieren Membranproteine mit einer geringeren Effizienz aus der Membran und nehmen meist wenig Einfluss auf die Struktur des Zielproteins. Zwitter-ionische Detergenzien vereinigen Charakteristika der nicht-ionischen und der schärferen ionischen Detergenzien. Die Proteine werden mit höherer Wirksamkeit extrahiert, können aber strukturell verändert werden. Die Reinheit der His₆-DctA-Extraktion unter Verwendung unterschiedlicher Detergenzien wurde durch eine SDS-PAGE ermittelt, in der die gleiche Menge isoliertes Protein eingesetzt wurde (Abb. 07). Die Reinheit wurde optisch geschätzt. Zwischen den Präparationen war kein markanter Unterschied feststellbar. In allen Spuren zeigte monomeres His₆-DctA ein duales Laufverhalten, wobei die 37 kDa Bande, welche dysfunktionales Protein repräsentiert, deutlich stärker ausgeprägt war. Anhand des SDS-PAGE Gels wurde der Anteil von monomerem His₆-DctA (funktional und

Tabelle 08: Effizienz der Extraktion von monomerem His₆-DctA (funktional und dysfunktional) mit verschiedenen Detergenzien. DDM = n-Dodecyl-β-D-maltosid, LDAO = N,N-Dimethyl-n-dodecylamine N-oxide, FC-12 = Fos-Cholin-12, Nonyl-M = n-Nonyl-β-D-maltosid, Undecyl-M = n-Undecyl-β-D-maltosid. Die Werte beziehen sich auf 1 l Kulturvolumen. Die Reinheit wurde anhand des SDS-Gels optisch geschätzt.

	Triton X-100		Empigen BB	
	Protein [mg]	Ausbeute (%)	Protein [mg]	Ausbeute (%)
Gesamtprotein	225	100	237	100
Membranprotein	54	24	55	23
Protein im Eluat	5,3	2,3	8,3	3,5
Reinheit		70 %		70 %
His₆-DctA	3,7	1,6	5,8	2,5

	DDM		LDAO	
	Protein [mg]	Ausbeute (%)	Protein [mg]	Ausbeute (%)
Gesamtprotein	205	100	200	100
Membranprotein	60	29	46	23
Protein im Eluat	6,7	3,3	3,7	1,9
Reinheit		70 %		70 %
His₆-DctA	4,7	2,3	2,6	1,3

	FC-12		Nonyl-M	
	Protein [mg]	Ausbeute (%)	Protein [mg]	Ausbeute (%)
Gesamtprotein	193	100	188	100
Membranprotein	52	27	43	23
Protein im Eluat	8,6	4,5	3,3	1,6
Reinheit		70 %		70 %
His₆-DctA	6	3,1	2,3	1,2

	Undecyl-M	
	Protein [mg]	Ausbeute (%)
Gesamtprotein	205	100
Membranprotein	53	26
Protein im Eluat	5,7	2,8
Reinheit		70 %
His₆-DctA	4	1,9

dysfunktional) am gesamten Protein in den His₆-DctA Präparationen optisch geschätzt. Dabei wurde angenommen, dass die Signale bei 36 kDa und 37 kDa auf dem Immunblot (Abb. 06B) monomerem His₆-DctA entsprechen. Aus dem eingesetzten Membranprotein und der geschätzten Reinheit wurden Ausbeute und Effizienz der Extraktionen bestimmt (Tabelle 08). Die prozentuale Ausbeute zum Gesamtprotein war unter Verwendung von Fos-Cholin-12 und Empigen BB mit 3,1 % bzw. 2,5 % am größten. In den Eluaten war fast ausschließlich dysfunktionales DctA enthalten.

4.1.3 Überproduktion von His₆-eCFP-L-DctA

Um die Löslichkeit von DctA zu steigern, wurde DctA mit dem *Enhanced Cyan Fluorescent Protein* (eCFP), einer GFP-Variante, fusioniert (Abb. 05B). Das Chromophor von eCFP wurde als Indikator genutzt, um Auskunft über den nativen Faltungszustand von DctA zu erhalten (Geertsma *et al.* 2008). In eCFP wurde die Mutation A206K eingeführt, welche die Homoaffinität des eCFP-Proteins reduziert (Zacharias *et al.* 2002). Das eCFP-Protein trägt einen Hexahistidin-Tag und befindet sich am N-terminalen Ende von DctA. Ein 36 AA langer Linker verbindet eCFP und DctA. Der Linker sollte verhindern, dass eCFP die Funktionalität von DctA durch räumliche Nähe beeinträchtigt und das katalytische Zentrum oder die Interaktionsstelle mit DcuS stört.

4.1.4 His₆-eCFP-L-DctA bildet eine funktionale und eine dysfunktionale Population

Bei der Überproduktion von Membranproteinen kommt es häufig zur Bildung von *Inclusion Bodies*, die dysfunktionales Protein in aggregiertem Zustand darstellen. *Inclusion Bodies* sind schwer oder überhaupt nicht mehr in Lösung zu bringen. Für eine GFP-DctA-Fusion wurde gezeigt, dass nach der Durchführung einer denaturierenden SDS-PAGE die Anregung des eCFP-Chromophors Rückschlüsse auf den Faltungszustand von DctA zulässt

(Geertsma *et al.* 2008). Die GFP-DctA-Fusion zeigte ein duales Laufverhalten, wovon nur die schneller migrierende Bande aktives Protein im nativen Faltungszustand repräsentiert und im SDS-Gel fluoresziert. Um den funktionalen DctA-Anteil der His₆-eCFP-L-DctA-Präparation qualitativ zu bestimmen, wurde das eCFP-Chromophor in einem SDS-Gel angeregt.

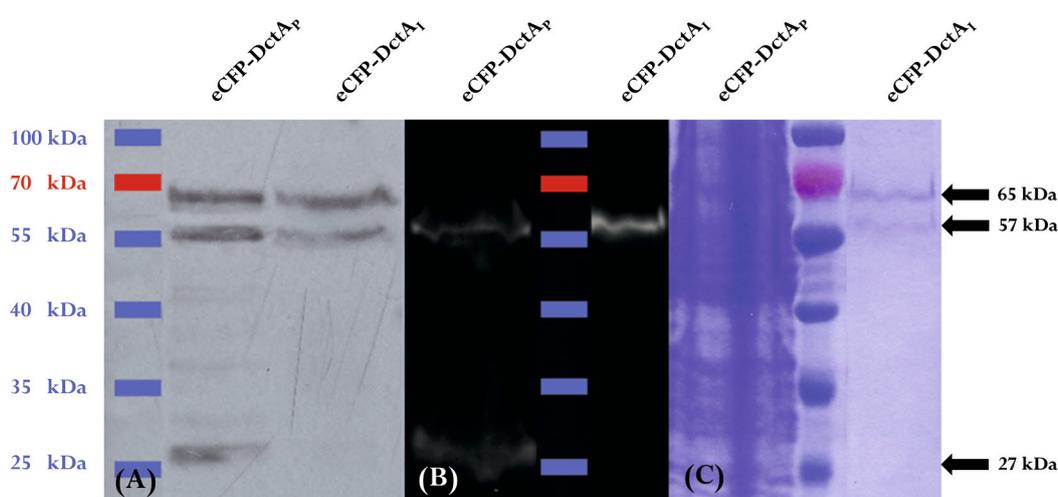


Abb. 08: Nachweis der nativen Faltung von His₆-eCFP-L-DctA über die Fluoreszenz von eCFP im SDS-Gel. C43 wurde mit pMW1928(His₆-eCFP-L-DctA) transformiert. Induktion von pMW1928 mit 600 μ M Arabinose für 2,5 h. (A) Mit Anti-His₆-Antikörpern behandelter Immunblot. (B) Vor der Färbung mit Coomassie wurde das SDS-Gel bei 437 nm angeregt und die Fluoreszenz digitalisiert. (C) SDS-Gel aus (B) nach Färbung mit Coomassie. eCFP-DctA_p = Ganze Zellen nach Induktion, eCFP-DctA_i = Isoliertes His₆-eCFP-L-DctA. eCFP-DctA_p = 200 μ g, eCFP-DctA_i = 4 μ g.

E. coli C43 wurde mit pMW1928 (His₆-eCFP-L-DctA) transformiert und in LB-Medium gezüchtet. Die Zellen wurden analog zur Überproduktion des His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukts behandelt. Mit den geernteten Zellen und isoliertem His₆-eCFP-L-DctA wurde eine SDS-PAGE und ein Western-Blot durchgeführt. Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abb. 08C) und auf dem Immunblot (Abb. 08A) waren bei 57 kDa und 65 kDa Banden erkennbar. In der Spur mit isoliertem His₆-eCFP-L-DctA trat auf dem Immunblot bei 27 kDa

eine weitere Bande auf. Vor der Färbung mit Coomassie wurde das eCFP-Chromophor im SDS-PAGE-Gel angeregt und digitalisiert (Abb. 08B). In allen Spuren zeigte sich bei 57 kDa ein fluoreszierendes Signal. In der Spur mit isoliertem His₆-eCFP-L-DctA zeigte sich bei 27 kDa eine fluoreszierende Bande, die aufgrund ihres Ansprechens im Immunblot wahrscheinlich abgespaltenes His₆-eCFP (26,9 kDa) repräsentiert.

Die Überproduktion von His₆-eCFP-L-DctA resultiert in der Bildung von zwei monomeren Protein-Populationen. Eine Population migriert in der SDS-PAGE bei etwa 65 kDa und besteht aus dysfunktionalem Protein, während die andere bei 57 kDa migriert und nativ gefaltetes, aktives Protein enthält.

4.1.5 His₆-eCFP-L-DctA besitzt eine höhere Löslichkeit als His₆-DctA

Die Überproduktion und Präparation der Zellen erfolgte analog zu His₆-DctA. Die separierten *E. coli* Membranen wurden mit unterschiedlichen Detergenzien behandelt und die Effizienz der Detergenzien in Hinblick auf Reinheit und Ausbeute der His₆-eCFP-L-DctA-Isolationen verglichen. Es wurden die Detergenzien Fos-Cholin-12, Empigen BB, n-Nonyl-β-D-maltosid (Nonyl-Maltosid), Lauryldimethylamine N-oxide (LDAO), n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM), n-Undecyl-β-D-maltosid (Undecyl-Maltosid), Octyl Glucose Neopentyl Glycol (OGNG) und Decyl Maltose Neopentyl Glycol (DMNG) verwendet. Die Reinheit der His₆-eCFP-L-DctA-Extraktionen wurde durch eine SDS-PAGE ermittelt, in der die gleiche Menge extrahiertes Protein eingesetzt wurde (Abb. 09). Bei 57 kDa und 65 kDa waren Banden erkennbar, auf deren Höhe sich auch auf dem Immunblot Signale zeigten (Abb. 10). Die Molekulare Masse des His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukts beträgt 78 kDa. Analog zu His₆-DctA und anderen GFP-fusionierten Transportern (Geertsma *et al.* 2008), zeigte monomeres His₆-eCFP-L-DctA in der SDS-PAGE duales Laufverhalten und eine niedrigere apparente Masse.

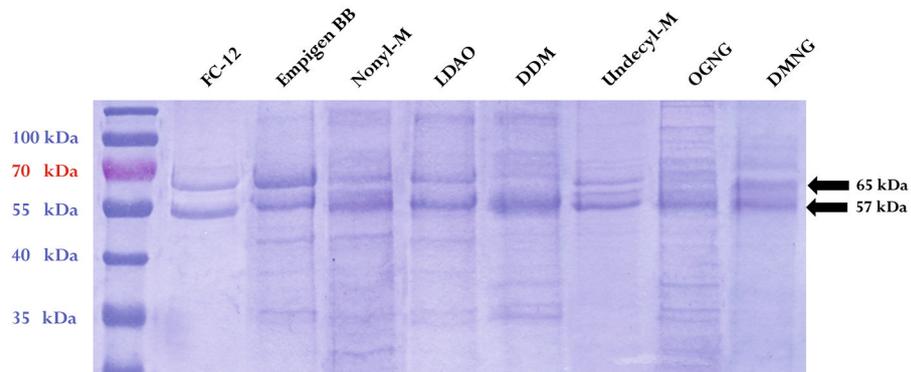


Abb. 09: Effizienz der Detergenzien in der Extraktion von His₆-eCFP-L-DctA aus der Membran. Es wurden jeweils 10 µg Protein aus Elutionsfraktionen aufgetragen. 57 kDa Bande = funktionales, monomeres His₆-eCFP-L-DctA, 65 kDa = dysfunktionales, monomeres His₆-eCFP-L-DctA. FC-12 = Fos-Cholin-12, Nonyl-M = n-Nonyl-β-D-maltosid, LDAO = N,N-Dimethyl-n-dodecylamine N-oxide, DDM = n-Dodecyl-β-D-maltosid, Undecyl-M = n-Undecyl-β-D-maltosid, OGNG = Octyl Glucose Neopentyl Glycol, DMNG = Decyl Maltose Neopentyl Glycol.

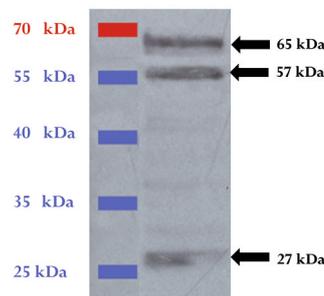


Abb. 10: Nachweis von His₆-eCFP-L-DctA im Gesamtprotein. Es wurden 200 µg Gesamtprotein eingesetzt. Der Immunblot wurde mit Anti-His₆-Antikörpern inkubiert.

Die untere Bande (57 kDa) im SDS-Gel ist ungefähr gleich ausgeprägt wie die obere Bande (65 kDa). In den His₆-DctA-Präparationen (Abb. 07) enthielt die obere Bande (37 kDa) fast das gesamte DctA. In den His₆-eCFP-L-DctA-Isolationen lag demnach ein größerer DctA-Anteil als aktives Protein vor. In den Spuren der DDM-, OGNG-, Nonyl-M- und Fos-Cholin-12-Präparationen war die untere Bande in Relation zur oberen Bande stärker ausgeprägt.

Tabelle 09: Effizienz der Extraktion von monomerem His₆-eCFP-L-DctA (funktional und dysfunktional) mit verschiedenen Detergenzien. FC-12 = Fos-Cholin-12, Nonyl-M = n-Nonyl-β-D-maltosid, LDAO = N,N-Dimethyl-n-dodecylamine N-oxide, DDM = n-Dodecyl-β-D-maltosid, Undecyl-M = n-Undecyl-β-D-maltosid, OGNG = Octyl Glucose Neopentyl Glycol, DMNG = Decyl Maltose Neopentyl Glycol. Die Werte beziehen sich auf 1 l Kulturvolumen. Die Reinheit wurde anhand des SDS-Gels optisch geschätzt.

	FC-12		Empigen BB	
	Protein [mg]	Ausbeute (%)	Protein [mg]	Ausbeute (%)
Gesamtprotein	183	100	225	100
Membranprotein	50	27	52	23
Protein im Eluat	4,75	2,6	13	5,7
Reinheit	95 %		75 %	
His ₆ -eCFP-L-DctA	4,5	2,5	9,75	4,3
	Nonyl-M		LDAO	
	Protein [mg]	Ausbeute (%)	Protein [mg]	Ausbeute (%)
Gesamtprotein	178	100	198	100
Membranprotein	53	30	60	30
Protein im Eluat	2	1,1	6,5	3,3
Reinheit	70 %		80 %	
His ₆ -eCFP-L-DctA	1,4	0,7	5,2	2,6
	DDM		Undecyl-M	
	Protein [mg]	Ausbeute (%)	Protein [mg]	Ausbeute (%)
Gesamtprotein	208	100	183	100
Membranprotein	62	30	42	23
Protein im Eluat	2,1	1	3,6	2
Reinheit	80 %		90 %	
His ₆ -eCFP-L-DctA	1,6	0,8	3,2	1,7
	OGNG		DMNG	
	Protein [mg]	Ausbeute (%)	Protein [mg]	Ausbeute (%)
Gesamtprotein	190	100	190	100
Membranprotein	57	30	57	30
Protein im Eluat	2,2	1,1	5,7	3
Reinheit	85 %		90 %	
His ₆ -eCFP-L-DctA	1,9	1	4,8	2,5

Die mit Fos-Cholin-12, Undecyl-M und DMNG behandelten Präparationen zeigten die größte Reinheit, wobei die DMNG-Präparation unscharfe Banden aufwies. (Abb. 09) Die Präparation mit OGNG, welches mit DMNG chemisch verwandt ist, wies ebenfalls undefinierte Banden auf. Die mit OGNG, Empigen BB, Nonyl-Maltosid und LDAO präparierten Proben hatten einen ähnlichen Reinheitsgrad.

Unter der Annahme, dass die Banden bei 57 kDa und 65 kDa monomerem His₆-eCFP-L-DctA entsprechen, wurde der Anteil von monomerem His₆-eCFP-L-DctA (funktional und dysfunktional) am gesamten Protein in den Präparationen auf dem SDS-PAGE Gel optisch geschätzt (Abb. 09). Aus dem eingesetzten Membranprotein und der geschätzten Reinheit wurden Ausbeute und Effizienz der Extraktionen bestimmt (Tabelle 09). Die prozentuale Ausbeute war unter Verwendung von Empigen BB (4,3 %), LDAO (2,6 %), Fos-Cholin-12 und DMNG (beide 2,5 %) am höchsten. Da die Fos-Cholin-12-Präparation sehr rein war (95 %), eine gute Ausbeute aufwies und im Vergleich zu anderen Detergenzien einen großen Anteil funktionales DctA enthielt, wurde Fos-Cholin-12 für die Extraktion von His₆-eCFP-L-DctA in den weiteren Experimenten verwendet.

4.2 Das His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukt verhält sich wie DctA_{wt}

4.2.1 Das His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukt besitzt Transportfunktionalität

Da durch die Fusion mit eCFP eine Beeinträchtigung der Transportfunktionalität von DctA möglich ist, wurde in Wachstumsexperimenten die Transportfunktionalität des His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukts überprüft. Unter aeroben Bedingungen mit neutralem pH ist DctA für das Wachstum von *E. coli* auf Fumarat essentiell. In der Variante MDO800 (DctA⁻) von *E. coli* AN387 ist *dctA* durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette ausgeschaltet. MDO800 wurde mit dem Plasmid pMW1928(His₆-eCFP-L-DctA) transformiert. Als Positivkontrolle wurde AN387(DctA⁺) verwendet. Während die Negativkontrolle

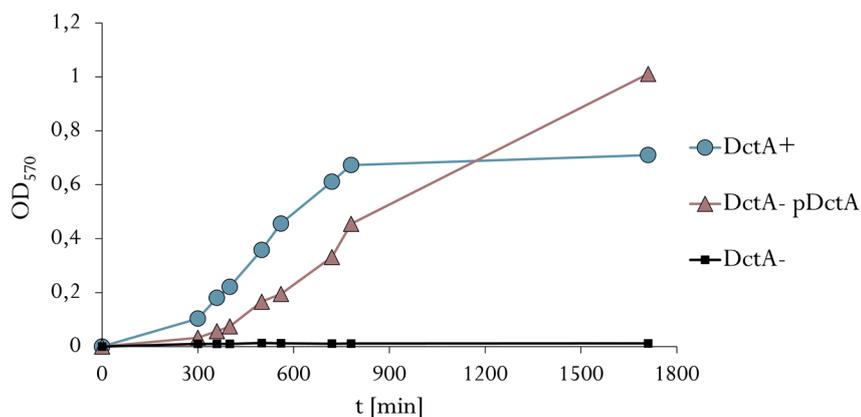


Abb. 11: Wachstumskomplementation des DctA-defizienten Stammes MDO800 mit His₆-eCFP-L-DctA. Die Zellen wurden bei pH 7 aerob in eM9-Medium bei 37 °C in Deepwell Platten gezüchtet. Als Kohlenstoffquelle diente Na₂-Fumarat (50 mM). Die Induktion von pMW1928 erfolgte mit 50 µM L-Arabinose bei t = 0 min. DctA+ = *E. coli* AN387, pDctA = pMW1928(His₆-eCFP-L-DctA), DctA- = MDO800.

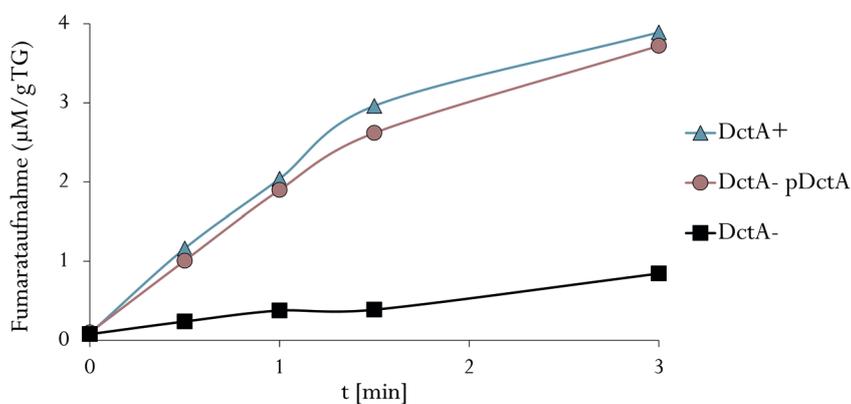


Abb. 12: Komplementation des Transports von [2,3-¹⁴C]Fumarat im DctA-defizienten Stamm MDO800 mit His₆-eCFP-L-DctA. [2,3-¹⁴C]Fumarat wurde 20 µM verwendet. Die Induktion von pMW1194 und pMW1928 erfolgte mit 50 µM L-Arabinose bei t = 0 min. DctA+ = pMW1194(DctA_{wt}), pDctA = pMW1928(His₆-eCFP-L-DctA), DctA- = MDO800.

MDO800 (DctA-) kein Wachstum zeigte (Abb. 11), wuchs MDO800(His₆-eCFP-L-DctA) wie AN387(DctA⁺).

Um die katalytische Aktivität des His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukts zu quantifizieren, wurde die Transportaktivität mit radioaktiv markiertem [2,3-¹⁴C]Fumarat gemessen (Abb. 12). Der DctA-defiziente Stamm *E. coli* MDO800 wurde mit den Plasmiden pMW1194 (DctA⁺) und pMW1928 (His₆-eCFP-L-DctA) transformiert. Die Negativkontrolle MDO800 (DctA-) zeigte eine basale Aufnahme von [2,3-¹⁴C]Fumarat. Die Transportaktivität von MDO800 (His₆-eCFP-L-DctA) entsprach MDO800 (DctA⁺) und war gegenüber der Negativkontrolle deutlich gesteigert.

Die Wachstums- und Transportexperimente zeigen die Transportfunktionalität des His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukts.

4.2.2 Das His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukt ist regulatorisch aktiv

Die C₄-Dicarboxylat-Transporter DctA und DcuB besitzen eine regulatorische Funktion (Unden *et al.* 2016). Sie bilden mit DcuS einen Sensorkomplex und versetzen die Sensorkinase in den für C₄-Dicarboxylate responsiven Zustand (Steinmetz *et al.* 2014; Scheu *et al.* 2014; Wörner *et al.* 2016). Werden DctA oder DcuB deletiert, erfolgt auch ohne den Effektor Fumarat eine dauerhafte Aktivierung der Zielgene des DcuSR Systems (Davies *et al.* 1999; Kleefeld *et al.* 2009; Steinmetz *et al.* 2014). Da der aerobe Transporter DctA bei artifizieller Expression unter anaeroben Bedingungen die regulatorische Funktion von DcuB übernehmen kann (Witan *et al.* 2012; Steinmetz *et al.* 2014), ist es möglich die regulatorische Funktionalität des His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukts im DcuB-defizienten Stamm IMW503 zu überprüfen.

Für das Experiment wurde ein *E. coli* Stamm mit *dcuB-lacZ* als Reportergen verwendet, der defizient für DcuB war (DcuB⁻) oder DcuB_{wt} chromosomal kodierte (DcuB⁺). Die Kulturen wurden anaerob in Glycerin/DMSO-Medium gezüchtet, mit und ohne

den Effektor Fumarat (Abb. 13). In dem Stamm mit DcuB (DcuB⁺) stimulierte erst die Anwesenheit von Fumarat die Expression von *dcuB-lacZ* (Faktor 8,5), während in dem DcuB-defizienten Stamm (DcuB⁻) bereits ohne Fumarat maximale Expression zu beobachten war. Dieses Ergebnis entspricht früheren Beobachtungen (Kleefeld *et al.* 2009; Witan *et al.* 2012A). Wenn im DcuB-negativen Stamm His₆-eCFP-L-DctA ersatzweise für DcuB exprimiert wurde, nahm die Expression von *dcuB-lacZ* in Abwesenheit von Fumarat deutlich ab, während die Expression in Anwesenheit von Fumarat hoch blieb (Faktor 3). Das His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukt kann DcuB unter anaeroben Bedingungen hinsichtlich seiner regulatorischen Funktion auf die Sensor kinase DcuS komplementieren, d.h. es ist regulatorisch aktiv.

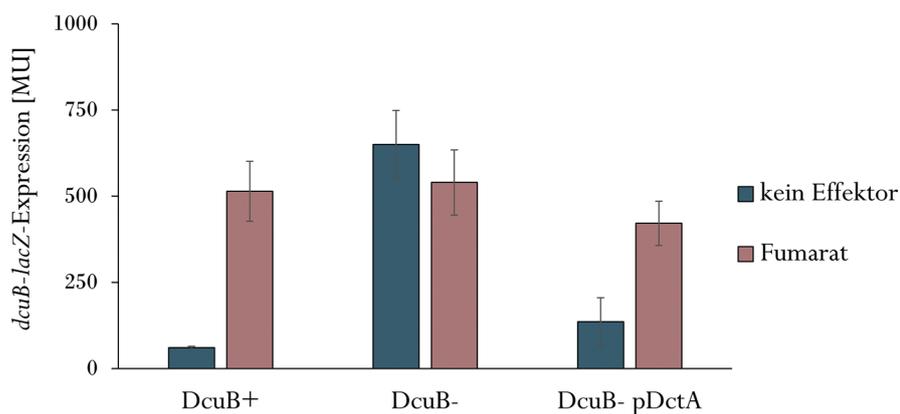


Abb. 13: Funktionskomplementation des DcuB-defizienten Stammes IMW503 mit His₆-eCFP-L-DctA. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit 50 mM Glycerin und 20 mM DMSO. Der Effektor Na₂-Fumarat wurde 20 mM verwendet. Das Plasmid pMW1928 wurde mit 50 µM L-Arabinose induziert. DcuB⁺ = *E. coli* IMW237, DcuB⁻ = IMW503, pDctA = pMW1928(His₆-eCFP-L-DctA).

4.3 Optimierung der Rekonstitution von DcuS und DctA

4.3.1 Die Konzentration der DctA- und DcuS-Präparationen wurde gesteigert

Ziel der DctA-Isolation war die Ko-Rekonstitution mit DcuS. Um für die Durchführung der Rekonstitution eine ausreichende DctA-Konzentration zu erhalten, wurde das Protokoll optimiert. Je Präparation wurde ein größeres Kulturvolumen und eine größere Menge an Ni^{2+} -NTA während der Affinitätschromatographie verwendet. Die Proteinkonzentration der His_6 -eCFP-L-DctA Elutionsfraktionen wurde von 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf 1,6 mg/ml gesteigert, die der His_6 -DcuS Elutionsfraktionen von 1,5 mg/ml auf 3,5 mg/ml . Da höhere Proteinkonzentrationen die Aggregation von Membranproteinen begünstigen, wurde mit geringen Mengen der Präparation eine SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 14). Es traten keine zusätzlichen Banden auf, die auf eine Aggregation der Präparationen hinwiesen.

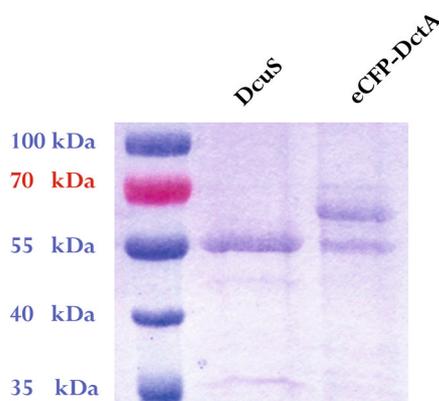


Abb. 14: His_6 -eCFP-L-DctA- und His_6 -DcuS Eluat mit hohem Proteingehalt. Die Proteinkonzentration der His_6 -eCFP-L-DctA- und His_6 -DcuS-Isolationen wurden gesteigert. Um zu überprüfen ob die hohe Konzentration die Aggregation der Proteine begünstigt, wurde mit jeweils 8 μg Protein eine SDS-PAGE durchgeführt. DcuS = His_6 -DcuS, eCFP-DctA = His_6 -eCFP-L-DctA.

4.3.2 His₆-eCFP-L-DctA und His₆-DcuS wurden in Membranvesikel rekonstituiert

Um den Einfluss von DctA auf die Aktivität von DcuS isoliert betrachten zu können, wurden His₆-DcuS und His₆-eCFP-L-DctA in künstliche Membranen ko-rekonstituiert. Die Konstrukte können in der *inside-out* (Abb. 15A) oder der *right-side-out* (Abb. 15B) Orientierung in die Lipidvesikel inserieren. In der *inside-out* Orientierung liegt der *in vivo* im Cytoplasma gelegene Teil eines Proteins außerhalb des Vesikels. Beide DctA-Termini, und damit His₆-eCFP, wären nach Außen gerichtet. Um eine wildtypische Interaktion von DcuS und DctA zu gewährleisten, müssen beide Proteine in der selben Orientierung rekonstituiert sein. Um die Proteine in die Lipidmembran zu integrieren, wurden die Lipide mit dem Detergenz Triton X-100 vollkommen destabilisiert (Abb. 16).

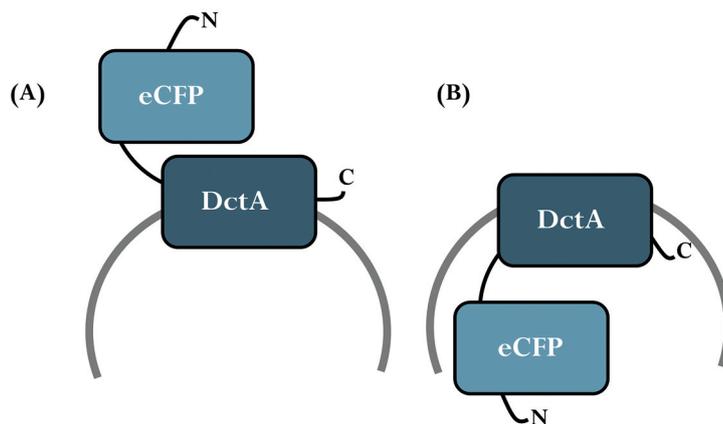


Abb. 15: Mögliche Orientierungen des His₆-eCFP-L-DctA Konstrukts nach der Rekonstitution in Liposomen. (A) *Inside-out* Orientierung, (B) *Right-side-out* Orientierung. Die Liposomen sind grün dargestellt.

Dies begünstigte eine zufällige Orientierung der Konstrukte (Geertsma *et al.* 2008B). Da der cytoplasmatische Anteil von DcuS größer als der periplasmatische ist, kann von einer Bevorzugung der *inside-out* Orientierung ausgegangen werden. In anderen Arbeiten wurden Phosphorylierungs-Experimente mit rekonstituiertem His₆-DcuS durchgeführt,

die eine *inside-out* Orientierung voraussetzten (Janausch 2001; Krämer 2007). Deshalb wurde für His₆-DcuS die *inside-out* Orientierung angenommen. Das DctA-Konstrukt (His₆-eCFP-L-DctA) besitzt durch die Fusion mit His₆-eCFP am cytoplasmatisch gelegenen N-Terminus ebenfalls eine große Ausdehnung, was die *inside-out* Orientierung begünstigt.

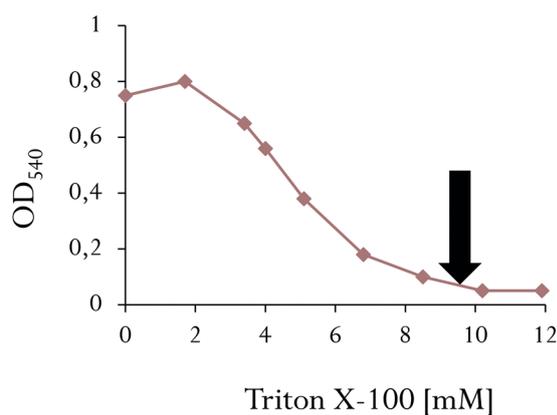


Abb. 16: Änderung der optischen Dichte von Liposomen bei Solubilisierung mit Triton X-100. Mit steigender Triton X-100-Konzentration werden Liposomen destabilisiert bis die Lipide vollständig gelöst vorliegen. Die Destabilisierung der Vesikel wurde über die OD₅₄₀ photometrisch bestimmt. Die Triton X-100 Konzentration in der Lipidlösung (*E. coli* Polar Lipid Extract) wurde je Messpunkt um 1,7 mM gesteigert. Bei der eingesetzten Endkonzentration von Triton X-100 lagen die Lipide vollständig gelöst vor (schwarzer Pfeil).

His₆-DcuS und His₆-eCFP-L-DctA wurden nach etablierten Protokollen (His₆-DcuS) rekonstituiert (Janausch *et al.* 2002B, Kneuper *et al.* 2005, Scheu *et al.* 2010B). Bei den verwendeten Membranen handelte es sich um polaren Lipidextrakt aus *E. coli* Membranen. Vor Zugabe der Membranproteine, wurden die vorgefertigten Liposomen mit Triton X-100 vollständig destabilisiert. Dies wurde anhand der optischen Dichte überprüft (Abb. 16). His₆-DcuS wurde in einem Protein:Lipid-Verhältnis (w/w) von 1:29 eingesetzt, His₆-eCFP-L-DctA in einem Verhältnis von 1:10. Wurden die Konstrukte ko-rekonstituiert, betrug das molare Verhältnis zwischen His₆-DcuS und His₆-eCFP-L-DctA 1:3. Triton X-100 wurde mittels Bio-beads langsam entfernt, was die Rückbildung von Lipid-Vesikeln und den Einbau der Konstrukte bewirkte.

Tabelle 10: Quantifizierung des Einbaus von His₆-DcuS in Liposomen. Die Rekonstitutionseffizienz wurde über einen BSA-Proteinstandard bestimmt. Mit rekonstituiertem His₆-DcuS und dem BSA-Proteinstandard wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und das SDS-Gel mit Coomassie gefärbt. Die Schwarzfärbung der Banden wurde mit dem Gel-Pro Analyzer gemessen und die rekonstituierte Proteinmenge bestimmt.

Eingesetzte Proteinmenge [μg]	Rekonstituiertes Protein [μg]	Einbau in Liposomen [%]
250	200	80

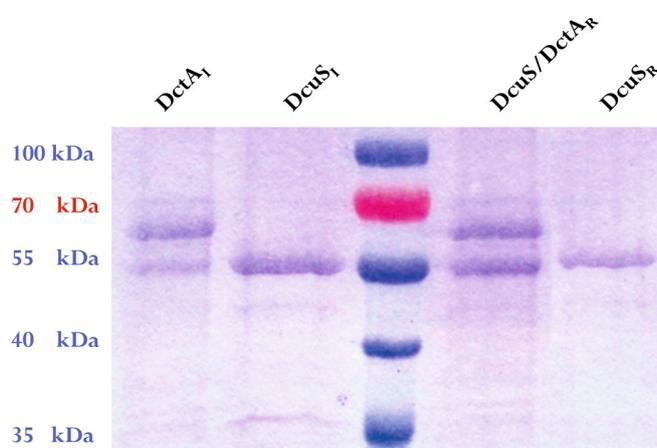


Abb. 17: Ko-Rekonstitution von His₆-DcuS und His₆-eCFP-L-DctA. His₆-DcuS und His₆-eCFP-L-DctA wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 rekonstituiert. DctA₁ und DcuS₁ = 7 μg. DcuS/DctA_R = 21 μg, DcuS_R = 5,6 μg. DctA₁ = Isoliertes His₆-eCFP-L-DctA, DcuS₁ = Isoliertes His₆-DcuS, DcuS/DctA_R = Ko-Rekonstituiertes His₆-DcuS und His₆-eCFP-L-DctA, DcuS_R = Rekonstituiertes His₆-DcuS.

Die Effizienz der His₆-DcuS-Rekonstitution wurde über den Vergleich mit einem BSA-Proteinstandard ermittelt. Mit der Software Gel-Pro Analyzer wurde die Schwarzfärbung von rekonstituiertem His₆-DcuS und dem Proteinstandard auf einem SDS-Gel bestimmt. Von der ursprünglich eingesetzten His₆-DcuS-Menge wurden 80 % in die Liposomen rekonstituiert (Tabelle 10). Da His₆-DcuS und His₆-eCFP-L-DctA in der SDS-PAGE gleich schnell migrieren (Abb. 17), konnte die Effizienz der Ko-Rekonstitution nicht über die Schwarzfärbung der DctA- und DcuS-Banden bestimmt werden. Für die Ko-Rekonstitution wurde ebenfalls eine Effizienz von 80 % angenommen.

4.4 Rekonstituiertes DcuS ist in Anwesenheit von DctA weniger aktiv

4.4.1 Nachweis der Phosphorylierung von His₆-DcuS mit dem Phosphoimager

Die Phosphorylierung von His₆-DcuS wurde nach etablierten Protokollen bestimmt (Janausch *et al.* 2002B, Kneuper *et al.* 2005). Die *in vitro* Autophosphorylierung von rekonstituiertem His₆-DcuS wurde mit radioaktiv markiertem [γ -³³P]ATP ermittelt. In Davies *et al.* 1999, Kleefeld *et al.* 2009 und Steinmetz *et al.* 2014 wurde gezeigt, dass DctA (bzw. DcuB) für eine wildtypische Funktionalität von DcuS benötigt wird. Fehlt DctA (DcuB), befindet sich die Sensor kinase in einem dauerhaft aktiven Zustand und die Aktivität wird in *dcuB-lacZ* Reporter gemessungen durch den Effektor Fumarat nicht weiter gesteigert. In rekonstituiertem His₆-DcuS wurde in Anwesenheit von Fumarat nach 30 min eine Steigerung der Autophosphorylierung um den Faktor 2 (Kneuper *et al.* 2005) beobachtet. Die Ko-Rekonstitution von His₆-DcuS und His₆-eCFP-L-DctA ist eine Erweiterung dieses *in vitro* Testsystems, da die Bedeutung von DctA für die Effektorresponsivität von DcuS in einem isolierten System betrachtet werden kann. Rekonstituiertes His₆-DcuS wurde mit und ohne den Effektor Fumarat inkubiert. Um eine homogene Verteilung im Lumen und außerhalb der Liposomen zu erhalten, wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von [γ -³³P]ATP gestartet und danach eine SDS-PAGE durchgeführt. Das Gel wurde auf eine Phosphoimager Platte gelegt. Die relative Radioaktivität wurde über die Schwarzfärbung mit der Software Gel-Pro Analyzer 6.0 gemessen.

Die Bandenintensität nahm bei Einsatz einer größeren Menge His₆-DcuS zu (Abb. 18). Die Inkubation von His₆-DcuS mit Na₂-Fumarat führte entgegen der Erwartung zu keiner nachweisbaren Änderung der Phosphorylierung. Da die Verwendung eines Szintillationszählers eine empfindlichere und quantitative Messung der Radioaktivität zulässt, wurde zu dieser Nachweismethode gewechselt.

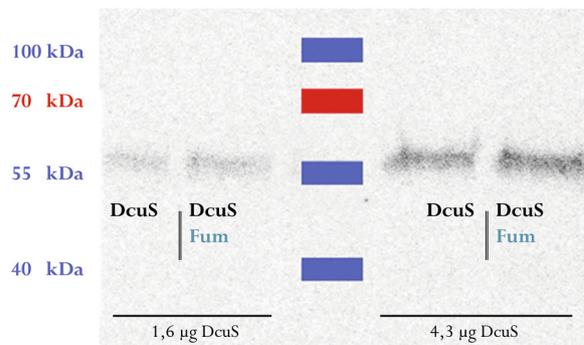


Abb. 18: Autophosphorylierung von rekonstituiertem His₆-DcuS: Einfluss von Na₂-Fumarat. His₆-DcuS (1,6 µg oder 4,3 µg) wurde für 45 min mit [γ -³³P]ATP (0,84 nM) bei 25 °C inkubiert. Es wurden Na₂-Fumarat (20 mM) und MgCl₂ (5 mM) eingesetzt. Nach Durchführung einer SDS-PAGE wurde die relative Radioaktivität mit dem Phosphoimager bestimmt.

4.4.2 Messung der Autophosphorylierung von His₆-DcuS mit dem Szintillationszähler

Um die Aktivität von His₆-DcuS zu quantifizieren, wurde die Phosphorylierung des Proteins nach Inkubation mit [γ -³³P]ATP mit dem Szintillationszähler gemessen. Es wurden His₆-DcuS-Liposomen und His₆-DcuS/His₆-eCFP-L-DctA-Liposomen mit und ohne Na₂-Fumarat eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von [γ -³³P]ATP gestartet, welches mit kaltem ATP verdünnt wurde.

Rekonstituiertes His₆-DcuS wird *in vitro* bis 7 % phosphoryliert (Janausch *et al.* 2002B). Der restliche Anteil wird wahrscheinlich aus energetischen Gründen nicht phosphoryliert. In His₆-DcuS-Liposomen wurde DcuS nach 5 min mit 1,12 mM [γ -³³P]ATP und Fumarat maximal 3,2 % phosphoryliert (Abb. 19). Durch Fumarat wurde die Phosphorylierung von DcuS 1,2- bis 1,8-fach gesteigert. In den DcuS-DctA-Liposomen war DcuS mit Fumarat maximal zu 2,2 % phosphoryliert. Mit DctA und Fumarat war DcuS um den Faktor 1,7 bis 2,3 schwächer phosphoryliert als ohne DctA. Mit Fumarat wurde die Phosphorylierung



Abb. 19. Einfluss von DctA und Fumarat auf die Autophosphorylierung von DcuS mit 1,12 mM $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ nach 5 min. Rekonstituiertes Protein wurde 8 μg His₆-DcuS entsprechend verwendet. Inkubation für 5 min mit $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (1,12 mM) bei 25 °C. Es wurden Na₂-Fumarat (20 mM) und MgCl₂ (5 mM) eingesetzt. Es wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Der Anteil an phosphoryliertem His₆-DcuS wurde über die Radioaktivität der aufgelösten His₆-DcuS-Banden eines SDS-Gels bestimmt. A, B und C sind unabhängige Ansätze.

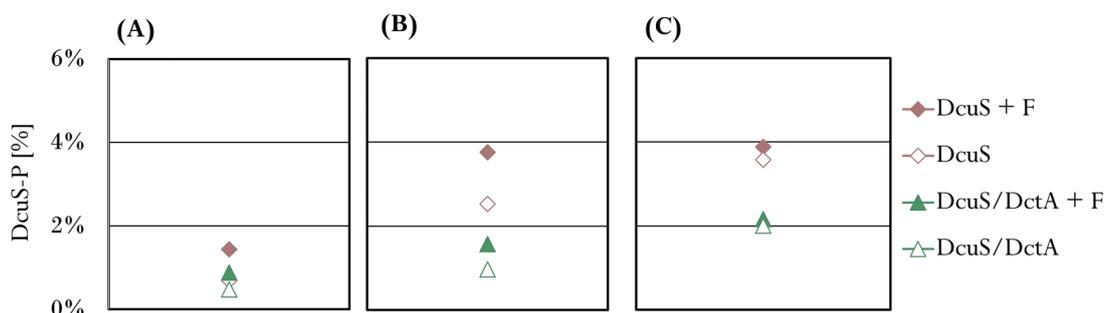


Abb. 20: Einfluss von DctA und Fumarat auf die Autophosphorylierung von DcuS mit 1,66 mM $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ nach 1, 3 und 8 min. Rekonstituiertes Protein wurde 8 μg His₆-DcuS entsprechend verwendet. Inkubation für 1 min (A), 5 min (B) und 8 min (C) mit $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (1,66 mM) bei 25 °C. Es wurden Na₂-Fumarat (20 mM) und MgCl₂ (5 mM) eingesetzt. Der Anteil an phosphoryliertem His₆-DcuS wurde über die Radioaktivität der aufgelösten His₆-DcuS-Banden eines SDS-Gels bestimmt.

in den DcuS-DctA-Liposomen 1,2- bis 1,5-fach gesteigert.

DcuS wurde mit 1,66 mM $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ für 1 min, 3 min und 8 min inkubiert (Abb. 20). DcuS war mit ko-rekonstituiertem DctA um den Faktor 1,5 bis 2,3 schwächer phosphoryliert. Mit Fumarat war DcuS mit und ohne DctA stärker phosphoryliert. Bei 8 min (Abb. 20C)

stieg die Phosphorylierung von DcuS gegenüber 3 min mit DctA weiter an, ohne DctA war sie auf dem gleichen Niveau. Um die Phosphorylierung von DcuS über die Zeit zu verfolgen, wurden Kinetiken mit und ohne Fumarat und DctA aufgenommen (Abb. 21).

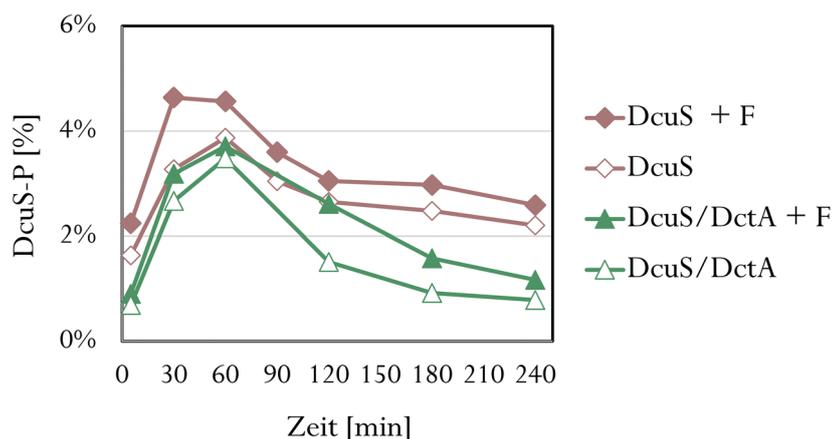


Abb. 21: Einfluss von DctA und Fumarat auf die Autophosphorylierung von DcuS mit 1,12 mM $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ im zeitlichen Verlauf. His₆-DcuS wurde mit $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (1,12 mM) bei 25 °C inkubiert. Es wurden Na₂-Fumarat (20 mM) und MgCl₂ (5 mM) eingesetzt. Nach 5 min und alle 30 bis 60 min wurde Protein 8 µg DcuS entsprechend entnommen.

In Präsenz von DctA wurde DcuS schwächer phosphoryliert und schneller dephosphoryliert. DcuS war mit und ohne Fumarat sowie DctA bei 30 bis 60 min maximal phosphoryliert. DcuS war bis zu 4,6 % phosphoryliert, DcuS/DctA bis zu 3,7 %. DcuS war um den Faktor 1,2 (120 min) bis 2,5 (5 min) stärker phosphoryliert als DcuS/DctA. Bis ca. 10 min (Abb. 21) oder später wurde DcuS schneller phosphoryliert als DcuS/DctA. Ab ca. 30 min erreichte DcuS /DctA mit Fumarat das Phosphorylierungsniveau von DcuS ohne Fumarat. Ab ca. 120 min wurde DcuS/DctA deutlich schneller dephosphoryliert als DcuS. Nach 240 min war DcuS und DcuS/DctA noch nicht auf dem ursprünglichen Phosphorylierungsniveau. In anderen Experimenten waren der Fumarat- und DctA-Effekt auf DcuS schwächer ausgeprägt (Abb. 22). Die Phosphorylierung von DcuS stieg im zeitlichen Verlauf nur geringfügig an und unterschied sich in Ansätzen mit und ohne DctA weniger deutlich.

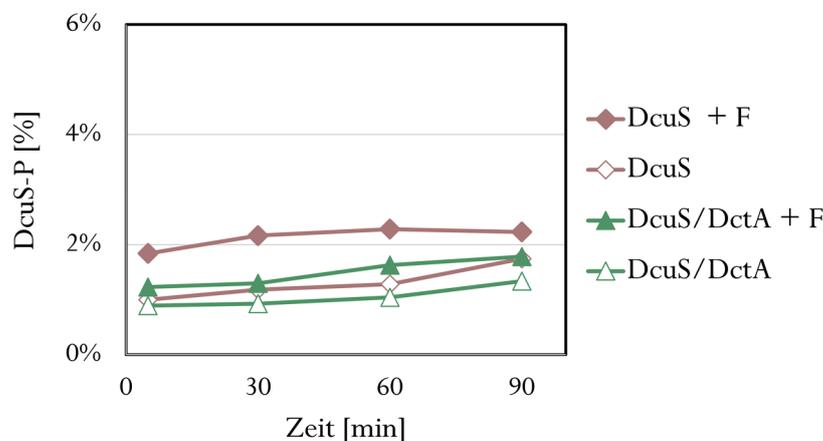


Abb. 22: Einfluss von DctA und Fumarat auf die Autophosphorylierung von DcuS mit 1,12 mM $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ im zeitlichen Verlauf. His₆-DcuS wurde mit $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (1,12 mM) bei 25 °C inkubiert. Es wurden Na₂-Fumarat (20 mM) und MgCl₂ (5 mM) eingesetzt. Nach 5 min und alle 30 bis 60 min wurde Protein 8 µg DcuS entsprechend entnommen.

4.5 Substratspezifität von DcuS

Die Sensor kinase DcuS bindet Effektoren über die PAS_p-Domäne. Um Aufschluss über die Koordination verschiedener Substrate innerhalb des katalytischen Zentrums zu erhalten, wurden PAS_p-Varianten von DcuS erstellt und die Aktivierung der Varianten durch die Substrate gemessen.

Die DcuS-PAS_p-Domäne wurde von Cheung und Hendrickson (2008) mit gebundenem L-Malat kristallisiert und die Struktur röntgenspektroskopisch aufgeklärt. Sie identifizierten die an der Koordinierung von L-Malat beteiligten Aminosäurereste. Bevor diese Strukturdaten bekannt waren, wurden in Kneuper *et al.* (2005) und Krämer *et al.* (2007) PAS_p-lokalisierte Reste mit Einfluss auf die Effektorbindung von DcuS untersucht. Interessante Reste wurden mit gerichteter Mutagenese ausgetauscht und die Aktivität der DcuS-Varianten mit verschiedenen Effektoren bestimmt. In Kneuper *et al.* (2005) wurde vorwiegend die Beschaffenheit eines für PAS_p-DcuS geeigneten Substrats untersucht, der Fokus von

Krämer *et al.* (2007) lag auf der unterschiedlichen Koordination von C₄-Dicarboxylaten und Citrat durch PAS_p-DcuS. In beiden Studien wurden hauptsächlich Fumarat und Citrat als Effektoren verwendet. In den folgenden Untersuchungen wurden mit den von Kneuper *et al.* (2005) und Krämer *et al.* (2007) erstellten DcuS-Varianten β -Galaktosidase Expressionsstudien (*dcuB-lacZ*) durchgeführt, diese aber mit einer breiteren Auswahl bekannter DcuS-Substrate untersucht. Ziel war es, über den Bindungsmodus von L-Malat und die Ergebnisse von Kneuper *et al.* (2005) und Krämer *et al.* (2007), Rückschlüsse auf die Koordination anderer Substrate durch PAS_p-DcuS zu ziehen.

Für die Experimente wurde ein *E. coli* Stamm mit *dcuB-lacZ* als Reportergen verwendet, der für DcuS defizient war. DcuS_{wt} und die entsprechenden DcuS-Varianten wurden über das Plasmid pMW181 bzw. dessen Derivate exprimiert, welches *dcuS* unter Kontrolle des eigenen Promoters enthält. Die Kulturen wurden anaerob in Glycerin/DMSO-Medium gezüchtet. Es wurde die Aktivität der DcuS-Varianten in Anwesenheit der Substrate Fumarat, Succinat, Citrat, L-Malat, D-Malat, L-Tartrat, D-Tartrat, L-Aspartat und Mesaconat gemessen.

4.5.1 Die DcuS-PAS_p-Domäne ist für L-Malat optimiert

Die Bindung von L-Malat erfolgt in DcuS durch die Seitenketten der Aminosäuren R107, H110 und R147. Die Reste K121, G140, F141 und L142 koordinieren L-Malat über Interaktion mit dem Proteinrückgrat (Cheung und Hendrickson 2008). In Kneuper *et al.* (2005) wurden die DcuS-Varianten DcuS-R107A, DcuS-H110A und DcuS-R147A erstellt. In *dcuB-lacZ*-Expressionsstudien wurden die Varianten durch Fumarat nicht aktiviert. Die Variante DcuS-F141S (Krämer *et al.* 2007) war für Fumarat responsiv, verlor aber die Sensitivität für Citrat. Die Variante DcuS-K121A wurde in dieser Arbeit erstellt.

DcuS_{wt} wurde durch L-Malat und Fumarat am stärksten aktiviert (Abb. 23). Mit D-Malat und D-Tartrat war die Aktivität reduzierter, mit L-Tartrat betrug sie 2/3 von L-Malat.

Succinat, Citrat und Mesaconat aktivierten DcuS in geringem Maße.

In Kneuper *et al.* (2005) und Krämer *et al.* (2007) war die Bindedomäne der Varianten DcuS-R107A, DcuS-H110A und DcuS-R147A unter Verwendung von Fumarat und Citrat inaktiv. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen perzipierte die Variante DcuS-R107A keines der getesteten Substrate. Die Varianten DcuS-R147A und DcuS-H110A waren jedoch für L-Malat spezifisch. Andere Substrate wurden nicht erkannt. DcuS-F141S wurde durch L-Malat auf Wildtypniveau aktiviert, andere Substrate induzierten eine reduzierte Aktivität. Das Substratspektrum von DcuS-K121A glich DcuS_{wt}, die Aktivität war jedoch leicht erhöht.

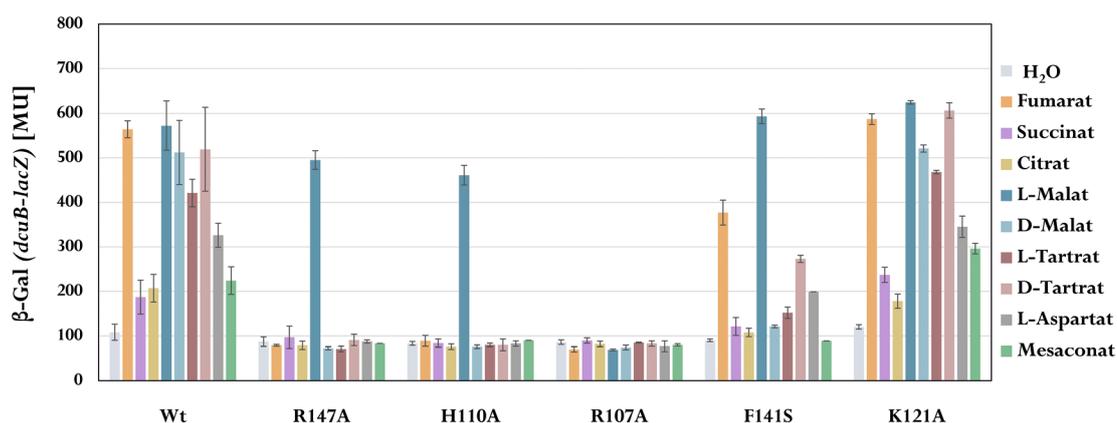


Abb. 23: Die Substratspezifität der DcuS-PAS_p-Varianten DcuS-R147A, DcuS-H110A, DcuS-R107A, DcuS-F141S und DcuS-K121A. Die Aktivität der DcuS-Varianten wurde über die Messung des Reportergens *dcuB-lacZ* in Miller Units (MU) bestimmt. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit 50 mM Glycerin und 20 mM DMSO. Die Effektoren wurde 20 mM verwendet. DcuS_{wt} und die DcuS-Varianten wurden durch pMW181 über den *dcuS*-Promoter in IMW260 (*dcuS::cam^R, dcuB-lacZ*) exprimiert.

Da fast alle DcuS-Varianten befähigt waren Substrate zu binden und regulatorisch aktiv waren, wurde eine native Faltung der Varianten angenommen. Der Austausch von DcuS-Resten die L-Malat mit der Seitenkette koordinieren (DcuS-R107A, DcuS-H110A, DcuS-R147A), hatte einen deutlichen Einfluss auf die Substratspezifität von DcuS. Die

Varianten perzipierten nur L-Malat oder kein Substrat. Wurden Reste ausgetauscht, die L-Malat mit dem Proteinrückgrat koordinieren, so war die Spezifität für alle Substrate, abgesehen von L-Malat, reduziert (DcuS-F141S) oder sie entsprach DcuS_{wt}. DcuS-PAS_p scheint für die Bindung von L-Malat optimiert zu sein. Obwohl die Substrate D-Malat, Tartrat und L-Aspartat zu L-Malat chemisch ähnlich sind, wurden sie von den Varianten schwächer oder gar nicht erkannt.

4.5.2 DcuS-Varianten von Resten, die in DcuS und CitA subtypisch konserviert sind

Die Sensorinasen DcuS und CitA gehören zur CitA/DcuS Familie und sind homolog aufgebaut. Innerhalb der PAS_p-Domäne wurden konservierte Reste identifiziert, die in beiden Sensoren an der Substratbindung beteiligt sind (Kneuper *et al.* 2005; Krämer *et al.* 2007). Andere konservierte Reste waren subtypisch für DcuS oder CitA (Krämer *et al.* 2007). DcuS bindet strukturell unterschiedliche Substrate und wird sowohl von C₄-Dicarbonsäuren als auch durch die C₅-Tricarbonsäure Citrat aktiviert. Um Aufschluss über die Differenzierung von DcuS zwischen C₄-Dicarboxylaten und Citrat zu bekommen, wurden in Krämer *et al.* (2007) die konservierten Reste mutiert und gegen Alanin oder die korrespondierenden Reste aus Citrat ausgetauscht. Über *dcuB-lacZ*-Expressionsstudien wurde die Aktivität der DcuS-Varianten bestimmt und dabei hauptsächlich Fumarat und Citrat als Effektoren eingesetzt. Im Folgenden wurde die Aktivität der von Krämer *et al.* (2007) erstellten DcuS-Varianten mit einer größeren Bandbreite an Effektoren getestet.

4.5.2.1 DcuS-Varianten, die für Substrate mit großen Substituenten spezifisch sind

Mit der Dreifachmutante DcuS-T101G-F120M-I125S wurde eine DcuS-Variante generiert, die keines der getesteten C₄-Dicarboxylate detektierte (Krämer *et al.* 2007) und nur

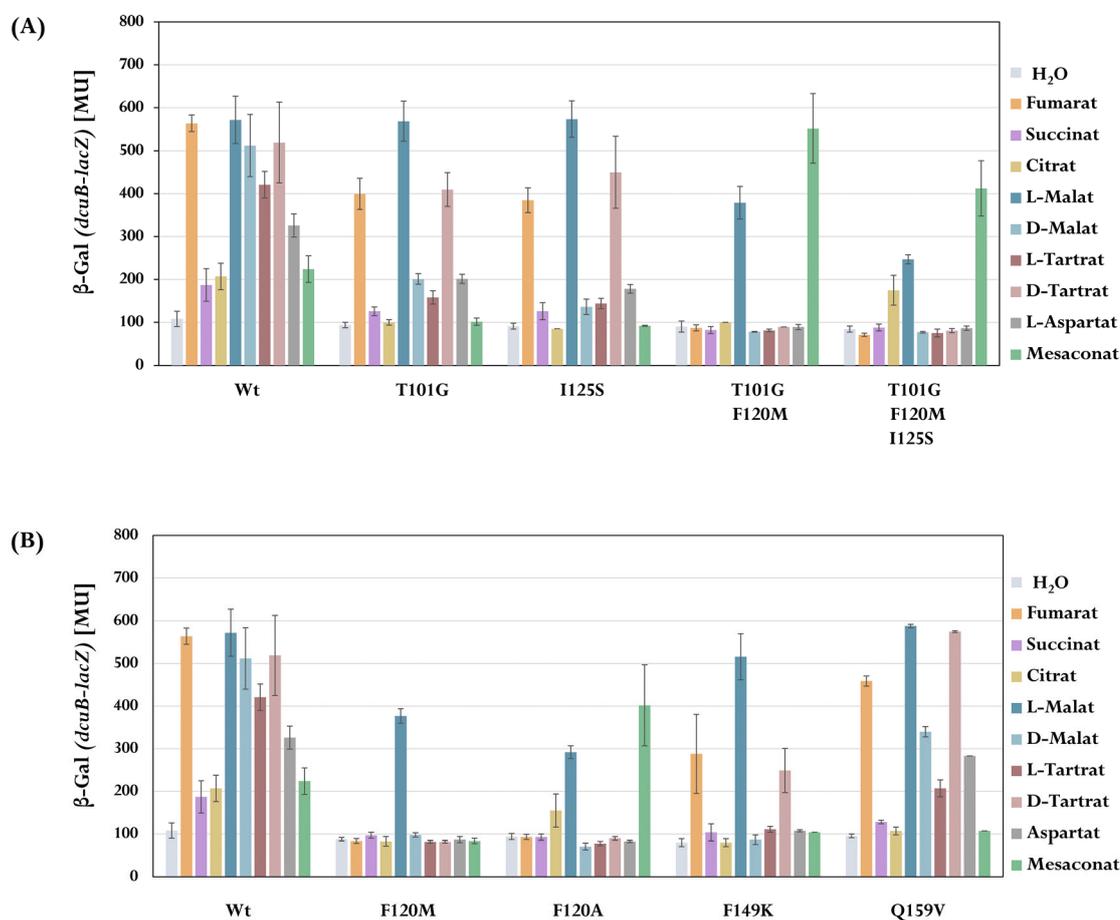


Abb. 24: Die Substratspezifität der DcuS-PAS_p-Varianten DcuS-T101G, DcuS-I125S, DcuS-T101G-F120M, DcuS-T101G-F120M-I125S, F120M, F120A, DcuS-F149K und DcuS-Q159V. Die Aktivität der DcuS-Varianten wurde über die Messung des Reportergens *dcuB-lacZ* in Miller Units (MU) bestimmt. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit 50 mM Glycerin und 20 mM DMSO. Die Effektoren wurde 20 mM verwendet. DcuS_{Wt} und die DcuS-Varianten wurden durch pMW181 über den *dcuS*-Promoter in IMW260 (*dcuS::cam^R, dcuB-lacZ*) exprimiert.

für größere Moleküle (Mesaconat und Citrat) spezifisch war. Die drei Reste bilden ein hydrophobes Interaktionsnetzwerk am unteren Teil der PAS_p-Bindetasche, weshalb eine Weitung der Bindetasche angenommen wurde, die den Zugang für Substrate mit größeren Substituenten (Mesaconat: Methyl-Gruppe, Citrat: Acetat-Gruppe) begünstigt. Varianten

mit den entsprechenden Einzel- oder Doppelmutationen waren für Fumarat oder weder für Fumarat noch Citrat spezifisch, wodurch ein synergistischer Effekt der drei Reste gezeigt wurde. Analog zu den Ergebnissen von Krämer *et al.* (2007) zeigte die Dreifachmutante DcuS-T101G-F120M-I125S (Abb. 24A) im Vergleich mit DcuS_{wt} eine um den Faktor 2,6 gesteigerte Aktivität mit Mesaconat und eine leicht reduzierte für Citrat. Abgesehen von L-Malat wurden kleinere Substrate nicht perzipiert. Die Vorstufen der Dreifachvariante waren entweder für die größeren Substrate Mesaconat und Citrat oder für die kleineren Substrate spezifisch. Eine Sonderstellung hatte L-Malat, welches von allen Varianten perzipiert wurde. Die Variante DcuS-T101G-F120M besaß eine sehr hohe Spezifität für Mesaconat und konnte L-Malat, aber kein Citrat, erkennen. Die Ergebnisse stützen die Aussage einer vergrößerten Bindetasche in der Dreifachmutante DcuS-T101G-F120M-I125S. Die Optimierung von DcuS-PAS_p für L-Malat wird zusätzlich unterstrichen.

4.5.2.2 DcuS bevorzugt C₄-Dicarboxylate, die an C2 (S)-konfiguriert sind

Nach Cheung und Hendrickson (2008) ist DcuS für L-Malat stereospezifisch, da zwischen dem Rest F120 und L-Malat hydrophobe Wechselwirkungen bestehen und die Seitenkette mit D-Malat in sterischen Konflikt gerät. Um den Einfluss von F120 auf die Stereospezifität zu untersuchen, wurde die Spezifität der Varianten DcuS-F120A und DcuS-F120M aus Krämer *et al.* (2007) für weitere Substrate getestet (Abb. 24B). DcuS-F120A besaß eine Spezifität ähnlich der Dreifachmutante mit vergrößerter Bindetasche (Abb. 24A). Die Variante detektierte neben den größeren Substraten Citrat und Mesaconat auch L-Malat. DcuS-F120M war nur für L-Malat spezifisch. Da DcuS_{wt} eine hohe Spezifität für D-Malat besitzt, konnte die Vermutung von Cheung und Hendrickson nicht bestätigt werden. Möglicherweise gingen Cheung und Hendrickson von einer starren Struktur der Substrate aus. Die Größe der Aminosäuren an Position 120 scheint jedoch Einfluss auf die Spezifität von DcuS zu haben, was im Einklang mit dem vermuteten sterischen Konflikt der Seitenkette mit den Substraten steht. Methionin ist eine Aminosäure mit

großer Seitenkette, die keinen apolaren Benzolring wie Phenylalanin besitzt. DcuS-F120M erkannte nur L-Malat. Der Austausch von Phenylalanin gegen die kleine Aminosäure Alanin resultierte in einer Spezifität für die großen Substrate Citrat und Mesaconat. Die Ergebnisse unterstreichen erneut die Optimierung von DcuS-PAS_p für L-Malat.

In Kneuper *et al.* 2005 wurden die strukturellen Voraussetzungen von Molekülen ermittelt, um von DcuS als Substrat erkannt zu werden. C₄-Dicarboxylate mit oder ohne hydrophile Substituenten am C2- und C3-Atom wurden erkannt. Aufgrund der Substituenten besitzen Malat, Tartrat und L-Aspartat an C2 chirale Zentren, die (R)- oder (S)-konfiguriert sind. Es wurde untersucht, ob die Konfiguration an C2 einen Einfluss auf die Spezifität von DcuS für die Substrate hat.

Die Spezifität von DcuS_{wt} wird von Substituenten an C2 und C3 der C₄-Dicarboxylate beeinflusst. Die Sensorkinase reagiert mit abnehmender Intensität auf die Substrate Malat (-OH), Tartrat (2x -OH) und Aspartat (-NH₂). Die an C2 (S)-konfigurierten Substrate L-Malat und D-Tartrat werden jeweils besser erkannt als ihre (R)-konfigurierten Enantiomere D-Malat und L-Tartrat. Der Vergleich mit den C₄-Dicarboxylat-sensitiven DcuS-Varianten (Abb. 23, 24) zeigt, dass die Spezifität für die (S)-konfigurierten Substrate stets höher ist. Das ebenfalls (S)-konfigurierte Substrat L-Aspartat induzierte in den Varianten meist sogar eine höhere Aktivität als D-Malat und L-Tartrat (DcuS-F141S, DcuS-T101G, DcuS-I125S, DcuS-Q159V). Die DcuS-PAS_p-Domäne besitzt demnach eine höhere Spezifität für die (S)-konfigurierten C₄-Dicarboxylate.

4.5.3 Molekulares Docking - Die Bindung von C₄-Dicarboxylaten durch DcuS-PAS_p

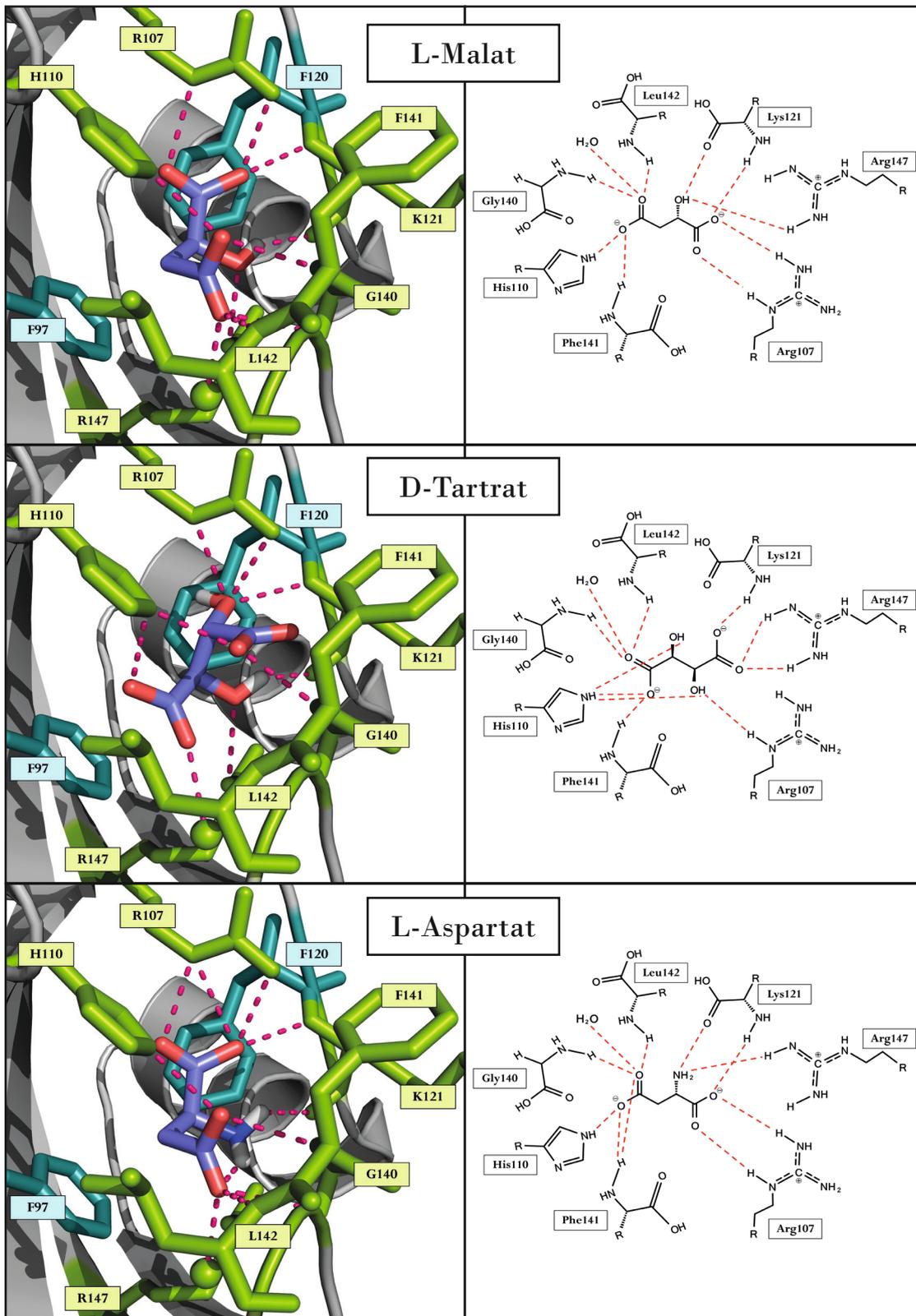
Die Struktur der DcuS-PAS_p-Domäne wurde mit gebundenem L-Malat gelöst (Cheung und Hendrickson 2008). Da die DcuS-PAS_p-Domäne strukturell flexibel ist, kann die Struktur nicht ohne Weiteres auf andere Substrate übertragen werden. Um die Bindungsmodi anderer Substrate aufzuklären, wurde die Spezifität von DcuS-Varianten für unterschiedliche

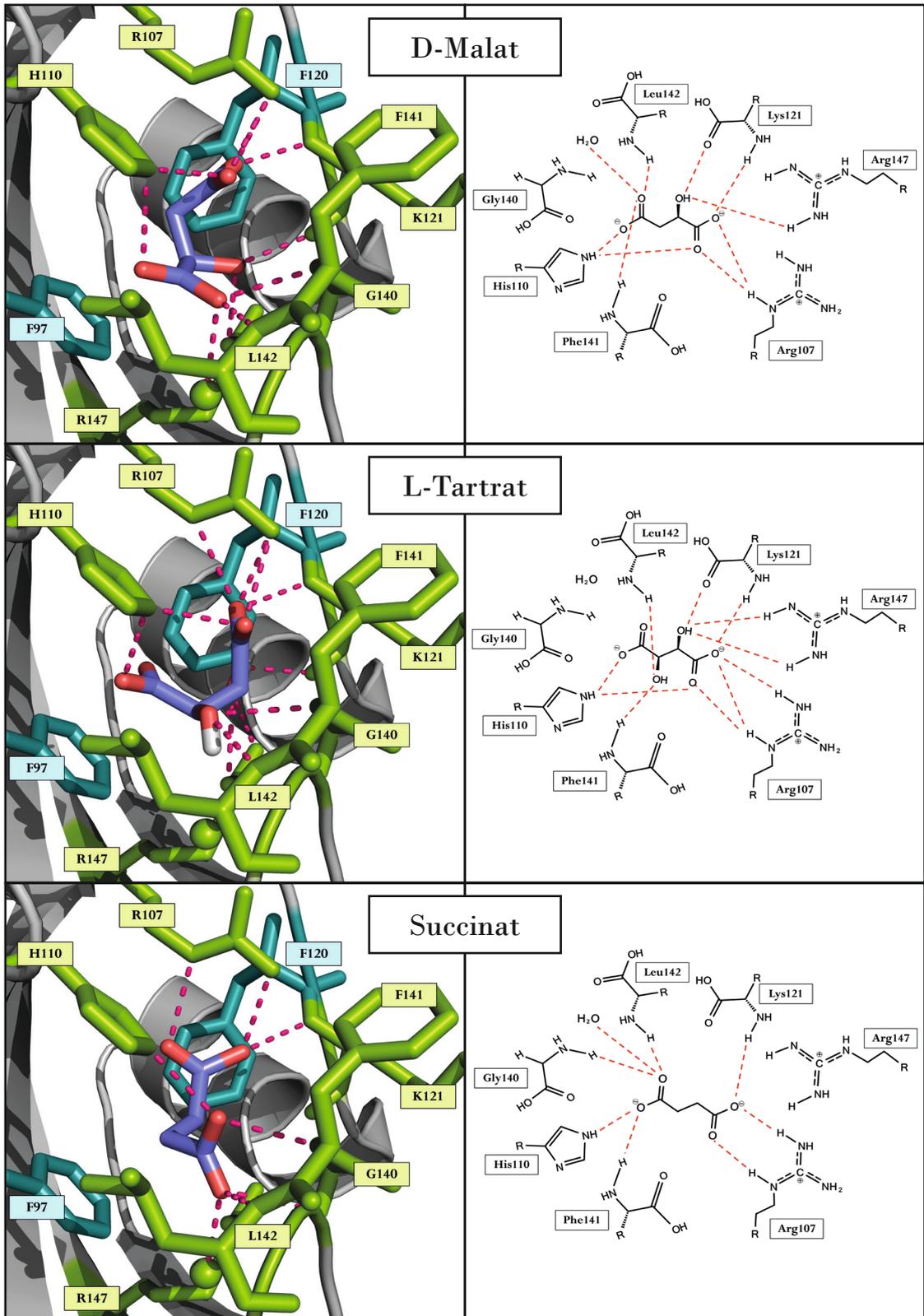
Substrate untersucht (4.5.2.2). Das relative Verhältnis der durch Malat, Tartrat und L-Aspartat induzierten DcuS-Aktivität war in DcuS_{wt} und den C₄-Dicarboxylat-sensitiven DcuS-Varianten ähnlich und ließ eine native PAS_p-Struktur vermuten. Mit der Software *Autodock Vina* (Trott *et al.* 2010) wurde eine *Molekulare Docking*-Studie durchgeführt, bei der die gelöste PAS_p-Struktur als feststehende Struktur in der L-Malat-Konformation angenommen wurde (Relative Affinitäten siehe Anhang A.2). Um die verwendeten Parameter zu verifizieren, wurde die Rezeptor-Liganden Interaktion zwischen DcuS-PAS_p und L-Malat berechnet. Das Ergebnis deckte sich mit der röntgenspektroskopisch ermittelten Koordination des Substrats durch die PAS_p-Domäne.

Die Liganden waren innerhalb der Bindetasche ähnlich orientiert (Abb. 25). Polare Wechselwirkungen wurden nur mit Aminosäuren ausgebildet, die an der Koordination von L-Malat beteiligt sind. Die Koordination und Positionierung von L-Aspartat und Succinat war der von L-Malat am ähnlichsten. L-Aspartat ist an C2 mit einer Amino- statt einer Hydroxy-Gruppe substituiert und ist ebenfalls (S)-konfiguriert. Die Koordination und räumliche Orientierung von Tartrat unterschied sich von Malat und L-Aspartat, was wahrscheinlich am zusätzlichen Substituent an C3 und der resultierenden Molekülgröße liegt. Cheung und Hendrickson vermuteten Stereospezifität von DcuS für L-Malat, da der C2-Substituent von D-Malat mit DcuS-F120 in sterischen Konflikt geraten würde. Tatsächlich befand sich der C2-Substituent aller Liganden in der Nähe von K121 und R147 und die restliche Molekülstruktur war entsprechend gedreht. Zusammen mit den Ergebnissen aus 4.5.2.2 kann eine wichtige Rolle von DcuS-F120 für die Positionierung der Liganden in der Bindetasche angenommen werden.

Die C1-Carboxylgruppen der Liganden wurden von K121 und R107 koordiniert, bei D-Tartrat war die Molekülstruktur gebogen. Der C2-Substituent war an der Stelle positioniert, wo sich bei den anderen Effektoren die erste Carboxylgruppe befand. Die C4-Carboxylgruppe wurde durch die Reste H110, F141, G142 und ein Wassermolekül koordiniert. Hier wichen beide Tartrat Enantiomere von der L-Malat Koordination ab.

Die Carboxylgruppen war in Richtung H110 gebogen und interagierten nicht mit anderen Resten. L-Malat ist ein strukturelles Element von Citrat. Die der C1-COOH-Gruppe entsprechende Substituent wurde analog zu L-Malat von R107 und K121 gebunden. Der OH-Substituent war analog zu dem in L-Malat positioniert und wurde ebenfalls von R147 koordiniert. Wie bei den C₄-Dicarboxylaten, bildete die „distale COOH-Gruppe„ eine H-Brücke mit H110 aus.





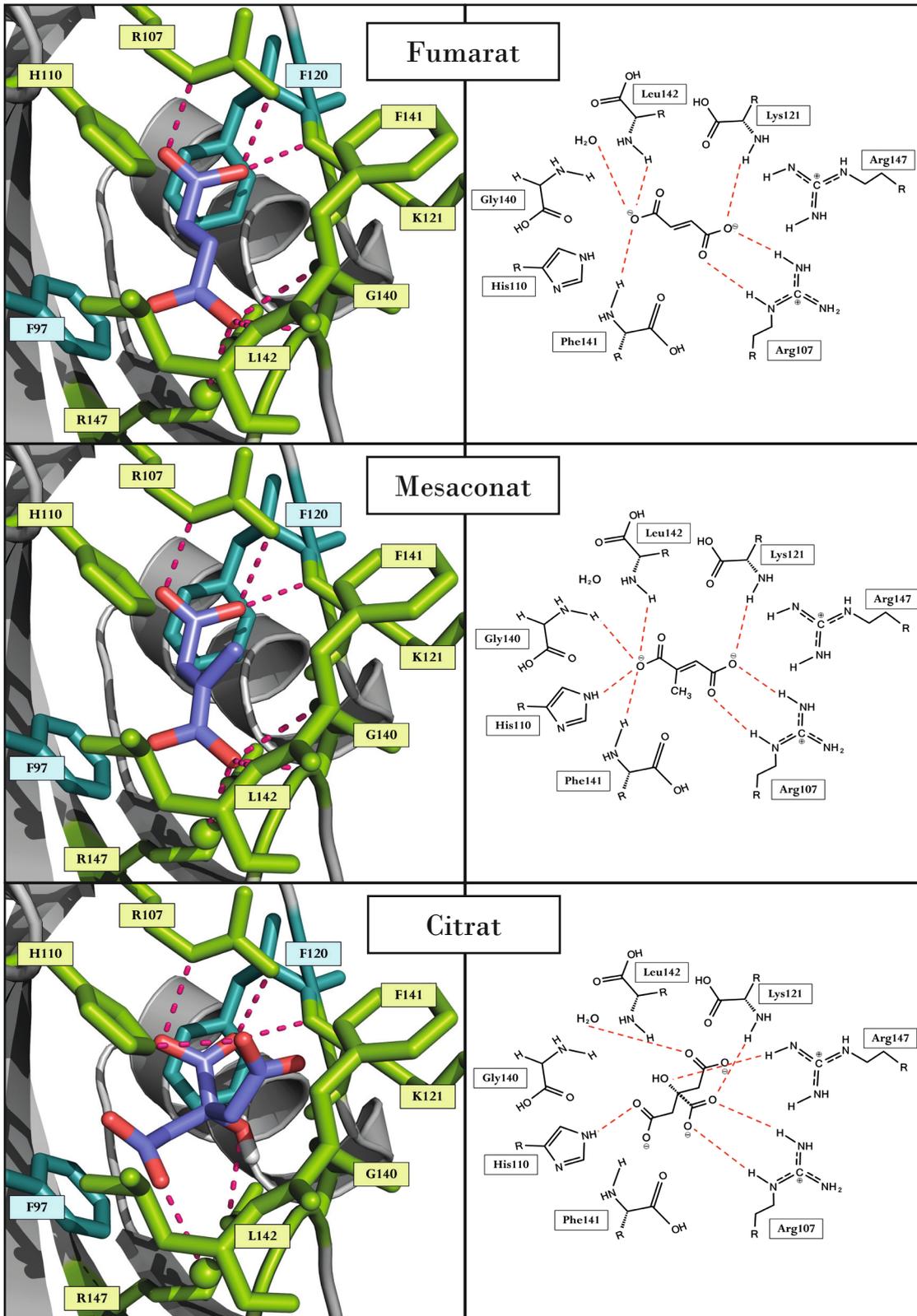


Abb. 25: Molekulares Docking - Wahrscheinliche Positionierung der Substrate L-Malat, D-Tartrat, L-Aspartat, D-Malat, L-Tartrat, Succinat, Fumarat, Mesaconat und Citrat innerhalb der DcuS-PAS_p-Domäne. Die Positionierung der Liganden wurde mit dem Programm *Autodock Vina* (Trott *et al.* 2010) berechnet und die Ergebnisse in *PyMOL 1.3* visualisiert. Als Rezeptor wurde die von Cheung und Hendrickson (2008) gelöste DcuS-PAS_p-Struktur in der Konformation mit gebundenem L-Malat verwendet. Für die Liganden wurde die zweifach deprotonierten Form angenommen. Mögliche Rezeptor-Liganden-Interaktionen wurden innerhalb eines Würfels mit 16 Ångström Kantenlänge berechnet, dessen Mittelpunkt auf L-Malat lag. Linke Seite: Positionierung der Liganden innerhalb der Bindetasche. Grün = Reste, die L-Malat koordinieren. Pink = Wasserstoffbrücken. Rechte Seite: Koordination der Liganden inklusive Wasserstoffbrücken (rot) in 2D dargestellt. (Berechnete relative Affinitäten befinden sich in Anhang A.2).

5 Diskussion

5.1 Überproduktion von DctA

Cytosolische Proteine können relativ problemlos mit hohen Ausbeuten überproduziert werden (Wingfield 2016). Die Überproduktion integraler Membranproteine ist oft toxisch für die Zelle und resultiert in niedrigen Ausbeuten oder der Bildung von *Inclusion Bodies* (Wagner *et al.* 2007). Um die Ausbeute an aktivem Protein zu maximieren, werden die Parameter der Überproduktion und Extraktion optimiert. Zudem stehen eine Vielzahl an Expressionssystemen (Studier *et al.* 1986, 1991; Skerra 1994; Guzman *et al.* 1995; Giacalone *et al.* 2006; Valdez-Cruz *et al.* 2010) und optimierten Expressionsstämmen (Miroux und Walker 1996; Wagner *et al.* 2008; Massey-Gendel *et al.* 2009; Gul *et al.* 2014) zur Verfügung. Membranproteine der β -Fass-Klasse wurden erfolgreich aus *Inclusion Bodies* extrahiert und in den nativen Faltungszustand überführt (Bannwarth und Schulz 2003). Dieses Vorgehen ist für Membranproteine mit α -helikaler Struktur nicht geeignet (Kiefer 2003). Die Überproduktion von α -helikalen Membranproteinen wie DctA zielt deshalb auf deren Insertion in die Zellmembran ab, aus der sie mittels Detergenz extrahiert werden.

5.1.1 Isoliertes His₆-DctA ist dysfunktional

Um den Transporter DctA mit hoher Ausbeute und Reinheit zu extrahieren, wurden die Überproduktionsparameter in Zeltner (2012) optimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die Extraktion des His₆-DctA-Konstrukts unter Verwendung der Detergenzien Fos-Cholin-12, Undecyl-Maltosid und Nonyl-Maltosid zu verbessern. Undecyl-Maltosid und Nonyl-Maltosid sind mit dem milden Detergenz Dodecyl-Maltosid (DDM) verwandt und unterscheiden sich von ihm in der Länge der Acylkette.

Fos-cholin-12 besitzt wie Empigen BB und LDAO eine zwitter-ionische Kopfgruppe, was die Beeinflussung der Proteinstruktur im Vergleich zu DDM begünstigt. Dennoch wurden Fos-cholin-12 und andere zwitter-ionische Detergenzien vor allem in NMR-basierenden Strukturuntersuchungen von Membranproteinen erfolgreich eingesetzt (Hwang *et al.* 2002; Oxenoid *et al.* 2005; Evanics *et al.* 2006; Drew *et al.* 2007). Die Schärfe eines Detergenz wird durch die Größe und Ladung der Kopfgruppe sowie der Länge der Acylkette bestimmt (Tate 2010). Schärfere Detergenzien extrahieren die Proteine mit höherer Effektivität aus der Membran, können jedoch die Struktur der Proteine beeinflussen oder diese sogar vollständig denaturieren lassen.

Bei der Extraktion von His₆-DctA wurden mit Fos-cholin-12 und Empigen BB, gefolgt von DDM, die höchsten Ausbeuten erzielt. Im SDS-Gel zeigte isoliertes His₆-DctA ein duales Laufverhalten, wobei dysfunktionales DctA (37 kDa) langsamer als nativ gefaltetes Protein (36 kDa) migrierte (Geertsma *et al.* 2008). Dies liegt in der reduzierten Anlagerung von SDS an partiell aggregiertes Protein begründet (Rath *et al.* 2009). Unabhängig vom verwendeten Detergenz enthielten die His₆-DctA-Eluate größtenteils dysfunktionale Proteinaggregate. Die Reinheit wurde durch die Detergenzien nicht beeinflusst. Die Verunreinigungen im Eluat besaßen eine größere Molekülmasse als DctA und wurden von Anti-His₆-Antikörper nicht erkannt, weshalb diese keine Abbauprodukte von DctA darstellen. Auf dem Immunblot waren reaktive Banden sichtbar, die das zwei- bzw. dreifache Molekulargewicht des His₆-DctA-Monomers aufwiesen. Da DctA vermutlich ein Trimer bildet (Groeneveld *et al.* 2010), handelte es sich wahrscheinlich um oligomeres His₆-DctA. Die Extraktion von His₆-DctA aus der Membran sowie dessen anschließende Isolierung destabilisierte das Protein. Die Membranfraktion enthielt funktionales und dysfunktionales DctA, in den Eluaten lag nur die dysfunktionale Proteinpoptulation vor. Innerhalb der Lipidmembran werden integrale Membranproteine durch zahlreiche physische Faktoren stabilisiert, die von Detergenzien nicht geboten werden (Seddon *et al.* 2004; Zoonens *et al.* 2014; Duquesne *et al.* 2016). Die Struktur von DctA wird hauptsächlich von

8 Transmembranhelices (TMs) gebildet. Da TMs relativ beweglich sind, neigen Proteine mit einer hohen Anzahl an TMs außerhalb des natürlichen Lipidmilieus zur Aggregation (Kiefer 2003; Korepanova *et al.* 2005). Zudem erzeugen sie eine große Oberfläche für inter- und intramolekulare hydrophobe Wechselwirkung, welche Aggregation oder Oligomerisierung fördern. Während des Faltungsprozesses nehmen Proteine den Zustand der kleinsten kinetischen Energie ein. Durch die Membran werden transmembrane Segmente jedoch in der Bewegung eingeschränkt und das Protein kann sich in einem lokalen Minimum kinetischer Energie befinden (Kiefer 2003). Die Extraktion aus der Membran kann deshalb eine Umlagerung des Proteins und dessen Aggregation bewirken. Die Proteine werden in einer dysfunktionalen Konformation „gefangen“, die sie aus energetischen Gründen nicht mehr verlassen können (Jahn und Radford 2005). Um DctA zu stabilisieren enthielten die Puffer Glycerin und DTT. Glycerin verbessert die Löslichkeit von Membranproteinen, indem es eine amphiphile Oberfläche zwischen hydrophoben Bereichen und dem polaren Lösungsmittel bildet (Vagende *et al.* 2009). DTT verhindert die Ausbildung von intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten, die sich innerhalb der Membran nicht bilden würden. Vor der Durchführung einer SDS-PAGE wurden die Proteinproben nicht aufgekocht, da dies zur Bildung weiterer Aggregate führte und eine größere Instabilität von DctA suggerierte. Im Temperaturbereich bis 140 °C werden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Proteinen verstärkt (Schellmann 1997).

5.1.2 Die Fusion von DctA mit eCFP erhöht den Anteil an aktivem Protein im Isolat

Durch die Fusion von DctA mit eCFP wurde ein Konstrukt erzeugt, mit dem DctA in funktionaler Form überproduziert, isoliert und *in vitro* für biochemische Experimente verwendet werden kann.

Um DctA zu stabilisieren und damit höhere Ausbeuten an funktionalem Protein zu erhalten, wurde der Transporter mit der GFP-Variante eCFP (*enhanced cyan fluorescent*

protein (Heim und Tsien 1996)) fusioniert. Durch den Austausch von Alanin gegen Lysin (A206K) wurde die Homoaffinität von eCFP unterdrückt (Zacharias *et al.* 2002). Da eCFP im Bezug auf DctA relativ groß ist (26,9 kDa) und DctA mit Helix 8b nahe des C-Terminus mit DcuS interagiert (Witan *et al.* 2012), wurde eCFP an den N-Terminus von DctA fusioniert. Um die mögliche Beeinträchtigung der DctA-Funktionalität durch eCFP zu minimieren, wurden die Fusionsproteine durch eine flexible Verbindungssequenz aus 36 Aminosäuren verbunden. *Linker*-Sequenzen können die Faltung, Stabilität und katalytische Aktivität des Zielproteins verbessern (Chen *et al.* 2013).

GFP ist sehr stabil und das Chromophor kann nach einer denaturierenden SDS-PAGE im Gel angeregt werden (Drew *et al.* 2006). Bei der Überproduktion eines integralen Membranproteins kann die Fluoreszenz des Chromophors als Indikator für dessen Membranassoziation und Lokalisation außerhalb von *Inclusion Bodies* genutzt werden (Drew *et al.* 2001, 2005; Geertsma *et al.* 2008). Für DctA wurde die Fluoreszenz zudem als Indikator für die Funktionalität des Transporters gezeigt (Geertsma *et al.* 2008).

Da die Lokalisation von integralen Membranproteinen durch hydrophobe Zielsequenzen am N-Terminus festgelegt wird, kann die Fusion von eCFP mit dem N-Terminus von DctA die Integration in die Membran behindern (Luirink *et al.* 2012). Um die korrekte Insertion in die Membran, Bildung der Quartärstruktur und katalytische Aktivität des Konstrukts zu überprüfen, wurden die Transport- und regulatorische Funktion von DctA als His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukt mit wildtypischem DctA *in vivo* verglichen. DctA-defiziente Stämme wuchsen nach Komplementation mit His₆-eCFP-L-DctA auf Minimalmedium mit Fumarat und transportierten markiertes [2,3-¹⁴C]Fumarat in die Zelle. In DcuB-defizienten Stämmen komplementierte His₆-eCFP-L-DctA die regulatorische Funktion von DcuB für die Sensor kinase DcuS. Die Biogenese und die regulatorische sowie katalytische Funktion von DctA als eCFP-DctA Fusion ist demnach nicht beeinträchtigt. Durch die Fusion von DctA mit eCFP wurde die Löslichkeit des Transporters gesteigert und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den DctA-Monomeren reduziert. In den Eluaten

der His₆-DctA-Extraktionen lag das Protein fast vollständig in dysfunktionalem bzw. aggregiertem und oligomerem Zustand vor. In den His₆-eCFP-L-DctA-Eluaten hingegen zeigte funktionales DctA (57 kDa) eine mit dysfunktionalem DctA (65 kDa) vergleichbare Prominenz im SDS-Gel. In den Eluaten war also mindestens 50 % des monomeren DctA katalytisch aktives Protein. Unter Verwendung von DDM und Fos-Cholin-12 war der Anteil höher und betrug 80 % bzw. 70 %. DDM und Fos-Cholin-12 scheinen bevorzugt DctA im nativen Faltungszustand zu solubilisieren. Im Gegensatz zu His₆-DctA führte die Konzentrierung des Proteins im Verlauf der Isolierung nicht zur vollständigen Aggregation. Die DctA Ausbeute variierte abhängig vom eingesetzten Detergenz. Mit den zwitterionischen Detergenzien Empigen BB, LDAO und Fos-Cholin-12, sowie dem nicht-ionischen Detergenz DMNG, wurden die höchsten Ausbeuten an monomerem DctA erzielt. Gegenüber den His₆-DctA-Extraktionen war die Ausbeute mit Empigen BB bei vergleichbarer Reinheit 1,7-fach gesteigert. Mit Fos-Cholin-12 und DDM war die Ausbeute um 1,3- bzw. 2,9-fach reduziert, dabei wurde jedoch eine deutlich verbesserte Reinheit von 80 % (DDM) bzw. 95 % (Fos-Cholin-12) erzielt.

Im SDS-Gel waren Verunreinigungen in den Eluaten erkennbar, die nach Anregung des eCFP-Chromophors nicht fluoreszierten und auf dem Immunblot keine Reaktion zeigten. Es handelt sich wahrscheinlich nicht um Abbauprodukte des DctA-Konstrukts sondern um Histidin-reiche Proteine, die oftmals in per Affinitätschromatographie behandelten Isolationen zu finden sind (Yernool *et al.* 2003; Groeneveld *et al.* 2010).

Nach der Protein-Isolation wurden DcuS und DctA rekonstituiert, wobei hohe relativ Proteinkonzentrationen benötigt werden. Um die DctA-/DcuS-Konzentration in den Eluaten zu steigern, wurden ein höheres Kulturvolumen und damit mehr Membranhomogenat je Isolierung eingesetzt. Während der Affinitätschromatographie wurden die Menge an Ni²⁺-NTA-Agarose erhöht, um die maximale Protein-Bindekapazität anzupassen. Bei höheren Proteinkonzentrationen treten vermehrt inter- und intramolekulare Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen auf, weshalb diese verstärkt zur

Oligomerisierung und Aggregatbildung neigen. Sowohl in den DctA- als auch in den DcuS-Eluaten stieg der Anteil an aggregiertem Protein nicht an.

5.1.3 Weitere Optimierung der Überproduktion von DctA

Bei der Überproduktion von Membranproteinen resultiert ein niedrigeres Expressionslevel tendenziell in höheren Ausbeuten an katalytisch aktivem Protein (Wagner *et al.* 2008; Narayanan *et al.* 2011; Schlegel *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2015). Ein prominentes Beispiel stellt der für Überproduktion und Strukturaufklärung häufig verwendete Expressionsstamm *E. coli* C43(DE3) dar (Miroux und Walker 1996; Hattab *et al.* 2015). Der Stamm besitzt eine Mutation im T7 RNA Polymerase-regulierenden Promoter, was eine 10-fache reduzierte Bildung der T7 RNA Polymerase und somit von T7-kontrollierten Genen bewirkt (Wagner *et al.* 2008).

Die Überproduktion von Membranproteinen kann auf verschiedenen Ebenen toxisch auf die Zelle wirken. Hohe Konzentrationen der rekombinanten mRNA besetzen die Ribosomen und blockieren die zelleigene Proteinsynthese (Dong *et al.* 1995; Hattab *et al.* 2014). Transkription und Translation werden entkoppelt, was das Wachstums der Zellen hemmt (Studier *et al.* 1990; Dong *et al.* 1995). Bei starker Induktion können selbst Leervektoren toxisch wirken (Miroux und Walker 1996). Einen großen Einfluss hat die Struktur des überproduzierten Proteins. Dabei können schon kleine Veränderungen wie ein angehängtes His-Tag die Toxizität deutlich steigern (Gubellini *et al.* 2011). Eine weitere Toxizitätsebene steht im Zusammenhang mit dem Sec-Translokon, welches sekretorische Proteine und integrale Membranproteine über die Membran transportiert bzw. in die Membran inseriert (Wickner *et al.* 2005; Luirink *et al.* 2012). Ribosomen-mRNA-Komplexe lagern sich an das Translokon an und hydrophobe Segmente werden ko-translational in die Membran inseriert. Integrale Membranproteine werden bei der Faltung durch das Sec-Translokon unterstützt. Werden die Translokasen durch translatierende Ribosomen austitriert,

kommt es bei freien mRNA-Ribosomen-Komplexen zu Translationsabbrüchen und der Bildung von unvollständig gefaltetem Protein (Wagner *et al.* 2007; Schlegel *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2015). Das Protein wird proteolytisch abgebaut oder lagert sich in Form von *Inclusion Bodies* im Cytoplasma ab. Das Sec-Translokon stellt während der Überproduktion von Membranproteinen einen Flaschenhals dar. Mögliche Optimierungen wären die Harmonisierung des Expressionslevels und der Kapazität des Translokons oder die Steigerung dessen Kapazität. Für Sec-Translokon abhängige Proteine kann ein individuelles Expressionslevel eingestellt werden bei dem keine Aggregate mehr auftreten (Schlegel *et al.* 2013). Es wäre denkbar einen Expressionsstamm zu konstruieren, der die Translokase in einer höheren Konzentration bildet.

Im Eluat wurde freies His₆-eCFP (26,9 kDa) nachgewiesen. Auf dem Immunblot trat eine reaktive Bande bei 27 kDa auf, welche nach Anregung des eCFP-Chromophors im SDS-Gel fluoreszierte. Die komplette Abspaltung von intaktem GFP wird auch von anderen Membranproteinfusionen berichtet (Newstead *et al.* 2007; Drew *et al.* 2007). Möglicherweise wird das His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukt unvollständig degradiert. Die Qualitätskontrolle für Membranproteine übernimmt hauptsächlich die membranständige Protease FtsH, deren katalytische Domäne sich im Cytoplasma befindet (Luirink *et al.* 2012; Langklotz *et al.* 2012; Sauer *et al.* 2016). FtsH erkennt Substrate durch einen freien Terminus von 10 - 20 hydrophoben Aminosäuren oder einem SsrA-Tag, welches bei Translationsabbruch C-terminal an die Polypeptidkette angefügt wird (Langklotz *et al.* 2012; Nyquist und Martin 2014). Bei diesem Mechanismus sollte das His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukt von der DctA-Seite aus hydrolysiert werden. Der proteolytischen Domäne von FtsH ist ein Entfaltungsprozess vorgeschaltet. Die Entfaltungskapazität von FtsH ist relativ schwach (Kihara *et al.* 1999; Herman *et al.* 2003). Besonders stabile oder ungeeignete Substrate können nicht entfaltet und abgebaut werden (Langklotz *et al.* 2012; Bittner *et al.* 2016). Aufgrund der Stabilität von eCFP (Cubitt *et al.* 1995) oder dessen Eigenschaften als cytosolisches Protein, kann eCFP durch FtsH möglicherweise nicht abgebaut werden. Ein

verfrühter Abbruch der Translation würde ebenfalls zur Bildung von freiem eCFP führen. Proteine werden vom N-Terminus aus synthetisiert, weshalb zuerst eCFP gefolgt von DctA gebildet wird. Am N-Terminus von DctA, und damit am C-Terminus von eCFP, befindet sich die hydrophobe Signalsequenz, welche den Bestimmungsort des Membranproteins kodiert. Sobald die Signalsequenz das Ribosom verlässt, wird sie durch SRP (*Signal Recognition Particle*) gebunden und die Translation stoppt (Luirink *et al.* 2012). Nach Bindung des mRNA-Ribosomen-Komplex an das Sec-Translokon wird die Translation fortgesetzt. Steht keine freie Translokase zur Verfügung, wird die Proteinsynthese ganz abgebrochen und die unvollständige Polypeptidkette (His₆-eCFP-L) wird freigesetzt. Wurde His₆-DctA ohne eCFP überproduziert, war nach langen Induktionszeiten kein Protein mehr nachweisbar (Zeltner 2012). Dies spricht dafür, dass freies eCFP zumindest teilweise durch den proteolytischen Abbau des DctA-Konstrukts entstanden ist.

Da DctA proteolytisch abgebaut wurde und inaktive Proteinpopulationen auftraten, kann die Überproduktion von DctA wahrscheinlich durch ein niedrigeres Expressionslevel optimiert werden. Die Expression von His₆-eCFP-L-DctA untersteht der Kontrolle des Arabinose Promoters, der durch variierende L-Arabinose Konzentrationen reguliert werden kann. Für bessere Ausbeuten an aktivem Protein bei geringen Induktionsstärken sind zahlreiche Beispiele bekannt (Wagner *et al.* 2008; Massey-Gendel *et al.* 2009; Schlegel *et al.* 2010; Narayanan *et al.* 2011). Beispielsweise wurden bei der Überproduktion von YidC-GFP und GltP-GFP Konstrukten über das T7-System nach 24 h 5-mal höhere Ausbeuten erzielt, wenn das Zielplasmid nicht durch den Induktor IPTG induziert wurde (Zhang *et al.* 2015).

Werden Proteine mit His-Tag per Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie gereinigt, sind die Isolate meist durch Histidin-reiche Proteine verunreinigt. In den Eluaten der His₆-DctA und His₆-eCFP-L-DctA-Extraktionen traten Verunreinigungen auf, die keine Abbauprodukte des Konstrukts darstellen. Oftmals wird die Affinitätschromatographie deshalb mit einem weiteren Reinigungsschritt per Gel-Filtration kombiniert (Jung *et al.* 1997;

Yernool *et al.* 2003; Groeneveld *et al.* 2010). Mittels Gel-Filtration können Verunreinigungen aus dem Eluat entfernt werden und die Homogenität und Stabilität der Isolation über Fluoreszenz bestimmt werden (Kawate *et al.* 2006). Die Methode geht allerdings auch mit Verlust und Verdünnung des Zielproteins einher. Die membranständigen Transporter LacS, LacY und das DctA-verwandte Protein GltP zeigt im SDS-Gel ebenfalls ein duales Laufverhalten von dem nur die schneller migrierende Bande aktives Protein repräsentiert. Die Entfernung der dysfunktionalen Proteinpopulation mittels Gel-Filtration ist schwierig, da dass aggregierte Protein kein definiertes Elutionsvolumen hat und nicht klar vom aktiven Protein-Anteil abgetrennt werden kann (Geertsma *et al.* 2008, *Suppl.*).

5.2 Rekonstitution von DcuS und DctA

Um den regulatorischen Einfluss von DctA auf DcuS zu untersuchen wurden beide Proteine in künstliche Membranen rekonstituiert. Zur Rekonstitution von Membranproteine in künstliche Membranen werden diese häufig zu Detergenz-destabilisierten Liposomen gegeben. Das Detergenz wird durch Polystyrol-Kügelchen gebunden, wodurch sich Proteoliposomen (sogenannte Vesikel) mit inseriertem Protein bilden (Rigaud *et al.* 1997). Die Insertion kann dabei in der *inside-out* oder *right-side-out* Orientierungen erfolgen. Bei der *inside-out* Orientierung liegt der *in vivo* im Cytoplasma gelegene Teil des Proteins außerhalb der Vesikel. Für Funktionsanalysen ist es entscheidend, dass beide Proteine in der gleichen Richtung in die künstliche Membran inseriert werden. Da der cytoplasmatische Anteil von DcuS größer als der periplasmatische ist, kann von einer Bevorzugung der *inside-out* Orientierung ausgegangen werden. Um die Insertion von DctA in der *inside-out* Orientierung in die Liposomen zu begünstigen, wurde das im Cytosol befindliche Fusionsprotein eCFP nicht über die TEV-Protease-Sequenz im Linker entfernt. Damit sollten beide Proteine unidirektional vorliegen. Gleichzeitig bietet die *inside-out* Orientierung von DcuS den Vorteil, dass dieses von außen für $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ zugänglich ist. In Versuchen bei

denen die Proteoliposomen mittels Ultraschall durchlässig gemacht wurden, änderte sich die Phosphorylierung von DcuS nicht, was als Hinweis auf die inside-out Orientierung von DcuS in den Proteoliposomen gewertet wird (Janausch *et al.* 2002). Da in einigen Phosphorylierungsexperimenten ein DctA-Effekt auf DcuS beobachtet wurde, muss DctA zumindest teilweise ebenfalls in der *inside-out* Orientierung rekonstituiert sein.

5.3 Regulation von DcuS durch DctA *in vitro*

5.3.1 Regulation in Zweikomponentensystemen und DcuSR

Zweikomponentensysteme (ZKS) bestehen typischerweise aus einer Sensorkinase und dem Antwortregulator. Man kennt mittlerweile Systeme, die für ihre Funktion regulatorische oder sensorische Hilfsproteine benötigen (Tetsch & Jung 2009; Buelow & Raivio 2010; Uden *et al.* 2016). Das ZKS DctBD aus *Sinorhizobium meliloti* ist für die Erkennung von Dicarboxylaten im Außenmedium verantwortlich (Yurgel und Kahn 2004). Der Dicarboxylat-Transporter DctA_{sm} modifiziert die Substratspezifität der Sensorkinase DctB (Reid und Poole 1998) und versetzt sie in den für Reize responsiven Zustand (Yarosh *et al.* 1989; Watson *et al.* 1990). Im UhpBA-ZKS aus *E. coli* übernimmt UhpT den Transport von Glucose-6-Phosphat. Das UhpT-Homolog UhpC besitzt eine niedrigere Transportkapazität und stellt vermutlich den Rezeptor für Reize dar. Das Signal wird an die Histidinkinase UhpB übertragen, welche keine Sensordomäne besitzt. Über den Responseregulator UhpA erfolgt die Aktivierung der Zielgene, darunter *uhpT* (Island & Kadner 1993; Schwöppe *et al.* 2003). Das BceRS-System reguliert die Bildung des ABC-Transporters BceAB, welcher in *Bacillus subtilis* für den Efflux bestimmter Peptid-Antibiotika verantwortlich ist (Gebhard und Mascher 2011; Kallenberg *et al.* 2013). Die Histidinkinase BceS selbst besitzt keine Sensordomäne. BceAB fungiert als Flux-Sensor und aktiviert abhängig von der Transportleistung die Kinase BceS (Fritz *et al.* 2015).

Über den Antwortregulator BceR erfolgt die Aktivierung von *bceAB*. Der Transporter reguliert somit die eigene Bildung. Das Einkomponentensystem CadC aus *E. coli* aktiviert bei niedrigem pH und hohen Lysin-Konzentrationen seine Zielgene (Tetsch *et al.* 2008). CadC fungiert als pH-Sensor, die Anwesenheit von Lysin wird indirekt durch Interaktion mit dem Lysin-Transporter LysP übermittelt (Rauschmeier *et al.* 2014). Der Transporter LysP besitzt demnach eine regulatorische Funktion.

Im DcuSR-Sensorsystem aus *E. coli* wird der Stimulus ausschließlich über die Sensorkinase DcuS wahrgenommen (Janausch *et al.* 2002; Steinmetz *et al.* 2014; Unden *et al.* 2016). Um adäquat auf Reize reagieren zu können, benötigt der Sensor die ko-regulatorisch wirksamen C₄-Dicarboxylat-Transporter DctA (aerob) und DcuB (anaerob). Sie versetzen DcuS in die für Effektoren responsive Konformation. Werden die Ko-Regulatoren deletiert, sind die Zielgene des DcuSR-Systems konstitutiv aktiv (Davies *et al.* 1999; Kleefeld *et al.* 2009). Die Einflussnahme von DctA auf die Aktivität von DcuS wurde mechanistisch aufgeklärt (Unden *et al.* 2016). Perzipiert DcuS einen Effektor im Periplasma, wird die Information über die Membran bis zur Kinase-Domäne transferiert. Dies geschieht über eine Kolbenhub-Bewegung der Transmembranhelix 2 (TM 2) in Richtung Periplasma (Monzel *et al.* 2015). Der Kolbenhub induziert eine Konformationsänderung von PAS_C, wodurch die Transautophosphorylierung der angeschlossenen Kinase-Domäne stimuliert wird. PAS_C ist gleichzeitig Eingangsstelle für Signale des Ko-Regulators DctA und damit Integrationsort der Stimuli von PAS_P und DctA. DcuS und DctA wechselwirken über Protein-Protein-Interaktion (Witan *et al.* 2012; Scheu *et al.* 2014). Seitens DctA wird die Interaktion durch Helix 8b vermittelt (Witan *et al.* 2012), in DcuS geschieht dies durch die PAS_C-Domäne (Monzel *et al.* 2013; Unden *et al.* 2016). Die Amplitude der Kolbenhubbewegung von TM 2 hängt vom perzipierten Effektor ab und korreliert mit der Aktivität von DcuS (Monzel *et al.* 2015). DcuS kennt also nicht nur die Zustände AN und AUS, sondern unterliegt einer abgestuften Regulation. Durch DctA erfolgt wahrscheinlich keine Feinregulation der DcuS-Aktivität. Die Aufgabe von DctA beinhaltet eher die

Überführung von DcuS in den für Substrate responsiven Zustand. PAS_C inhibiert die Tätigkeit der angeschlossenen Kinase-Domäne, die sich ohne PAS_C oder bei verringerter PAS_C-Dimerisierung im AN-Zustand befindet (Monzel *et al.* 2013). Die PAS_C-Domäne ist sehr beweglich (Etzkorn *et al.* 2008) und wird wahrscheinlich durch DctA entsprechend positioniert und in der Dimerisierung unterstützt (Uden *et al.* 2016). Durch die Dimerisierung wird PAS_C empfänglich für Signale von TM 2 und in ihrer Konformation beeinflussbar. DctA stabilisiert also die AUS-Konformation von PAS_C.

5.3.2 DctA inhibiert *in vitro* die Phosphorylierung von DcuS

Der Fumarat-Effekt wurde *in vitro* für rekonstituiertes DcuS gezeigt (Janausch *et al.* 2002). In dieser Arbeit wurden erstmals *in vitro* neben dem Fumarat-Effekt zusätzlich der Einfluss von DctA auf rekonstituiertes DcuS im isolierten System nach definierten Zeitpunkten und als Kinetik untersucht. Entsprechend der Befunde aus *in vivo* Untersuchungen wurde die Phosphorylierung von DcuS durch Fumarat stimuliert und durch DctA inhibiert (Abb. 26). Die Effekte hingen in ihrer Ausprägung voneinander ab, waren aber dennoch unabhängig voneinander beobachtbar. Der Fumarat-Effekt war in Präsenz von DctA schwächer und schien vom Zeitpunkt der Messung abzuhängen. Obwohl die DcuS-Aktivität in Expressionsstudien in Abwesenheit der Ko-Regulatoren DctA und DcuB mit Fumarat bzw. L-Malat nicht weiter gesteigert wird (Davies *et al.* 1999; Kleefeld *et al.* 2009), wird rekonstituiertes DcuS mit Fumarat stärker phosphoryliert als ohne Fumarat (Janausch *et al.* 2002). In der Kinetik (Abb. 21) wurde mit und ohne DctA die maximale Phosphorylierung von DcuS nach der gleichen Zeit erreicht, bzw. begann der Anteil an phosphoryliertem DcuS geringer zu werden. Die maximale Phosphorylierung von DcuS war in Präsenz von DctA allerdings geringer als ohne DctA. Zusätzlich nahm der Anteil an phosphoryliertem DcuS in Anwesenheit von DctA schneller ab. Entweder wird DcuS mit DctA rascher dephosphoryliert oder die Kinase Domäne bleibt ohne DctA

länger aktiv. Bei der Autophosphorylierung von DcuS wird die γ -Phosphogruppe von ATP unter Bildung eines Phosphoramidats auf Histidin übertragen. Die Verbindung ist instabil und freies Phosphohistidin zerfällt unter Normalbedingungen leicht, wird aber abhängig von der Umgebung im Protein stabilisiert (Klumpp und Krieglstein 2002). Möglicherweise ist die Hydrolyse des Phosphoramidats in der DctA-stabilisierten AUS-Konfiguration der Kinase-Domäne begünstigt.

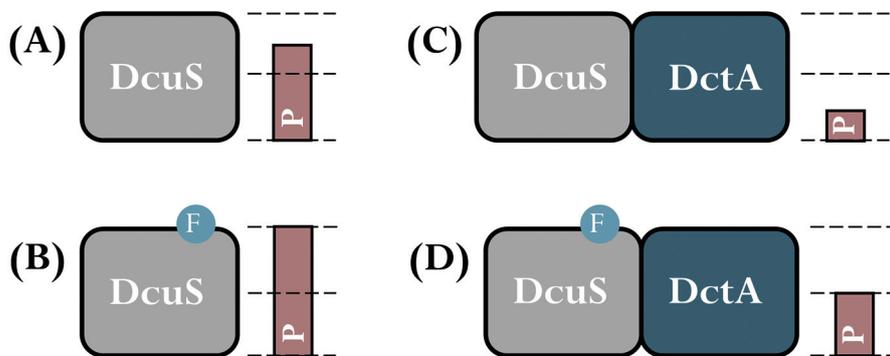


Abb. 26: Einfluss von Fumarat und His₆-eCFP-L-DctA auf die *in vitro* Phosphorylierung von rekonstituiertem His₆-DcuS. (A) Ohne die Interaktion mit dem Ko-Regulator DctA ist die Phosphorylierung von DcuS auch in Abwesenheit des Effektors Fumarat hoch. (B) Fumarat-Effekt: Die Anwesenheit von Fumarat bewirkt eine Steigerung der DcuS-Phosphorylierung. (C) DctA-Effekt: Der Ko-Regulator DctA hemmt die Phosphorylierung von DcuS. DcuS zeigt eine basale Phosphorylierung. (D) Fumarat- und DctA-Effekt: Auch in Anwesenheit von DctA bewirkt Fumarat eine Steigerung der DcuS-Phosphorylierung. Das Phosphorylierungsniveau liegt jedoch niedriger als DcuS ohne DctA. In den Phosphorylierungsexperimenten war das Phosphorylierungsniveau von (A) und (D) teilweise gleich. Blaues (F) = Fumarat. Größe des roten Pfeils = Phosphorylierungsniveau von DcuS.

DcuS wird mit physiologischen ATP-Konzentrationen *in vitro* bis 7 % phosphoryliert (Janausch *et al.* 2002). In dieser Arbeit war die maximale Phosphorylierung von DcuS geringer. Die verwendeten ATP-Konzentrationen waren nicht physiologisch, da *in vivo* ATP-Konzentrationen bis 3 mM auftreten (Tran und Unden 1998; Janausch *et al.* 2002). Der K_m -Wert von DcuS (0,16 mM) wurde jedoch um ein Vielfaches überschritten (Janausch *et al.* 2002).

Unabhängige DcuS- und DctA-Isolationen schienen einen unterschiedlichen Anteil an aktivem Protein zu enthalten, da in den Experimenten der Fumarat- bzw. DctA-Effekt bei gleicher ATP-Konzentration, DcuS-Menge und Durchführungszeit verschieden ausgeprägt war. Teilweise nahm die Phosphorylierung von DcuS im zeitlichen Verlauf kaum zu (Abb. 22). Auch bei tiefen Temperaturen (-80 °C) können die Proteine durch Lagerung denaturieren, was zusätzlich durch Auftauen und Einfrieren begünstigt wird. Eine mögliche Erklärung wäre zudem die partielle Hydrolyse von DcuS-P durch den niedrigen pH-Wert des Entfärbepuffers für Coomassie-gefärbte SDS-Gele. Phosphoramidate besitzen eine hohe Bindungsenergie und sind vor allem in saurem Milieu instabil (Wei und Matthews 1991). Um die SDS-Gele zu entfärben und die DcuS Bande sichtbar zu machen waren trotz konstanter Bedingungen unterschiedliche Einwirkzeiten nötig.

5.3.3 Weitere Untersuchungen des DcuS/DctA *in vitro* Testsystems

In Janausch *et al.* (2002) wurde ein funktionales *in vitro* System erzeugt, in dem die Signaltransduktion des DcuSR-Systems isoliert untersucht werden kann. Mittlerweile ist die Rolle der Transporter DctA und DcuB als Ko-Regulatoren der Sensorkinase DcuS bekannt. In dieser Arbeit wurde das System von Janausch *et al.* (2002) erweitert und DcuS mit dem Regulator DctA ko-rekonstituiert. In ersten Phosphorylierungsexperimenten hatte rekonstituiertes DctA einen regulatorischen Einfluss auf DcuS, was die Grundlage für die Etablierung eines funktionalen DcuS/DctA *in vitro* Systems bildet. Die bisherigen Ergebnisse waren nicht konstant und sowohl Fumarat- als auch DctA-Effekt variierten in der Ausprägung. Es sind weitere Experimente notwendig, um die Rekonstitutionseffizienz von DctA bzw. die Aktivität und Orientierung von rekonstituiertem DctA in Liposomen zu bestimmen. Die Aktivität von rekonstituiertem DctA kann über Transportmessungen mit radioaktiv markiertem Substrat quantifiziert werden. Da die Fluoreszenz des His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukts proportional zu der Menge an DctA ist, kann die Rekonstitutionseffizienz

über die Differenz der Fluoreszenz vor und nach der Rekonstitution hergeleitet werden. Die Fluoreszenz des Konstrukts bietet ebenfalls einen Ansatzpunkt, um die Orientierung von rekonstituiertem DctA zu erkennen. Im Linker des His₆-eCFP-L-DctA-Konstrukts befindet sich eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease, welche abhängig von der DctA-Orientierung in den Liposomen von Außen zugänglich ist. Mittels Ultrazentrifugation können die Liposomen mit Protein von abgespaltenem His₆-eCFP separiert werden. Durch Zugabe eines Detergenz (z.B. Triton X-100) werden die Liposomen durchlässig gemacht, womit die Schnittstelle unabhängig von der Orientierung durch die Protease angreifbar wird. Differiert die Fluoreszenz mit und ohne Triton X-100 nach der Zentrifugation, muss die TEV-Erkennungssequenz innerhalb des Liposoms liegen.

Durch Zugabe von DctA wurde das Phosphorylierungsniveau von DcuS erniedrigt. Es ist nicht eindeutig, ob rekonstituierte DcuS- und DctA-Proteine zu Interaktion befähigt sind und die Hemmung durch DctA wirklich auf regulatorische Effekte zurückgeführt werden kann. Um sekundäre Effekte auszuschließen, könnte DcuS mit einer DctA-Variante ko-rekonstituiert werden, die keine Interaktion mit DcuS zeigt. Die Phosphorylierung von DcuS sollte in Anwesenheit der Variante nicht erniedrigt werden. Hierfür würde sich die DctA-Variante DctA-L141A aus Witan *et al.* (2012) eignen, welche einen Aminosäureaustausch in Helix 8b besitzt. Das Experiment wäre zudem ein indirekter Hinweis auf die Orientierung von rekonstituiertem DctA, welches für eine funktionale Regulation entsprechend DcuS in der *inside-out* Orientierung sein muss.

5.4 Substratspezifität der Sensorkinase DcuS

Die Sensorkinase DcuS beinhaltet eine periplasmatische (PAS_p) und eine cytoplasmatische (PAS_c) PAS-Domäne. PAS_p bindet Effektoren im Periplasma und löst damit eine Signalkaskade aus. PAS_c ist an der Dimerisierung der DcuS-Monomere beteiligt und dient der Signalweiterleitung von der Transmembran-Domäne zur Kinase-Domäne

(Monzel *et al.* 2015). Vertreter der PAS-Superfamilie findet man in Tieren, Pflanzen und Bakterien (Gu *et al.* 2000). Sie sind durch ihre dreidimensionale Struktur bestehend aus fünf β -Faltblättern und einer variierenden Anzahl und Anordnung von α -Helices definiert (Möglich *et al.* 2009; Chang *et al.* 2010). In vielen Multi-Domänen Proteinen stellt das PAS-Motiv die Sensor-Domäne, da sie ein breites Spektrum unterschiedlicher Reize wahrnehmen können. Zu den möglichen Stimuli gehören kleine Liganden wie C_4 -Dicarboxylate, der Energiestatus der Zelle, Sauerstoff oder Photonen (Taylor und Zhulin 1999; Gu *et al.* 2000). Der Photosensor PYP (*photoactive yellow protein*) ist der strukturelle Prototyp einer PAS-Domäne und aktiviert die nachgeschaltete Signalkaskade durch Konformationsänderung (Borgstahl *et al.* 1995; Imamoto und Kataoka 2007).

DcuS gehört, zusammen mit der namensgebenden Sensorkinase CitA aus *Klebsiella pneumoniae*, zur CitA-Familie (Bott *et al.* 1995; Janausch *et al.* 2002). Die homologen Sensoren haben eine Sequenzidentität von 27 % und eine ähnliche Quartärstruktur sowie Funktionsweise (Janausch *et al.* 2002; Sevvana *et al.* 2008; Monzel *et al.* 2015; Uden *et al.* 2016). Die Effektor-Perzeption wird in beiden Proteinen durch eine periplasmatische PAS-Domäne (PAS_p) realisiert. Während CitA als Citrat-Sensor fungiert, kann DcuS verschiedene C_4 -Dicarboxylate und Citrat wahrnehmen (Kaspar *et al.* 1999; Kneuper *et al.* 2005). Die Strukturen der CitA und DcuS Sensordomänen mit koordiniertem Citrat bzw. L-Malat wurden röntgenspektroskopisch aufgeklärt (Reinelt *et al.* 2003; Sevvana *et al.* 2008; Cheung und Hendrickson 2008). Die PAS_p -Domänen von DcuS und CitA enthalten homologe und konservierte Reste, die für die Substratbindung verantwortlich sind (Krämer *et al.* 2007). In Krämer *et al.* (2007) wurden DcuS- PAS_p -Varianten erstellt, um die Unterscheidung zwischen Citrat und C_4 -Dicarboxylaten durch DcuS zu klären. Experimente zum Substratspektrum von DcuS- PAS_p wurden in Kneuper *et al.* (2005) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Varianten von Krämer *et al.* (2007) und Kneuper *et al.* (2005) in *dcuB-lacZ* Expressionsstudien mit zusätzlichen Effektoren untersucht, um die Bindungsmodi anderer Substrate als L-Malat durch DcuS- PAS_p zu

klären. Ergänzend wurde die Rezeptor-Liganden-Interaktion zwischen den Substraten und DcuS-PAS_p chemoinformatisch mit *Molekularem Docking* analysiert.

5.4.1 Die DcuS-PAS_p-Domäne ist für das Substrat L-Malat optimiert

DcuS erkennt C₄-Dicarboxylate und Citrat, welches strukturell L-Malat mit einer zusätzlichen Acetyl-Gruppe entspricht. In *dcuB-lacZ* Expressionsstudien wurde die Aktivierung von DcuS durch Substrate gemessen, welche sich durch ihre Substituenten der C₄-Kohlenstoffkette und der chiralen Konfiguration unterscheiden (Abb. 27). Die DcuS-PAS_p-Domäne stellte sich als für L-Malat optimiert heraus. Der Effektor wird aufgrund der Art und Anzahl der Substituenten sowie der (S)-Konfiguration am chiralen Zentrum C2 gegenüber den anderen Substraten bevorzugt. Dies ermöglicht offensichtlich eine optimale Positionierung des C₄-Dicarboxylat-Grundgerüsts in DcuS-PAS_p.

DcuS_{wt} wurde durch Malat, Tartrat und L-Aspartat in absteigender Intensität aktiviert. Die C₄-Dicarboxylate unterscheiden sich durch ihre Substituenten an C2 und C3 der Kohlenstoffkette. DcuS favorisierte Malat, welches an C2 eine OH-Gruppe aufweist. Der Effektor wurde deutlich schwächer gebunden, wenn der C2-Substituent durch -NH₂ ersetzt wurde (L-Aspartat). Ein zusätzlicher OH-Substituent an C3 (Tartrat) wurde trotz der resultierenden Molekülgröße besser toleriert als L-Aspartat. DcuS selektierte die Substrate zudem nach der chiralen Konfiguration an C2. Die (S)-konfigurierten Substrate L-Malat und D-Tartrat aktivierten DcuS stärker als deren (R)-konfigurierten Stereoisomere D-Malat und L-Tartrat.

Die Beschaffenheit des C2-Substituenten ist für DcuS-PAS_p ein wichtiges Kriterium. Dies erklärt auch die hohe Affinität des Sensors für Fumarat, welches DcuS neben L-Malat am stärksten aktivierte. Succinat besitzt ebenfalls keine Seitenketten, wurde von DcuS jedoch viel schlechter erkannt. Die Kohlenstoffkette von Fumarat beinhaltet eine Doppelbindung, was die Beweglichkeit des Moleküls einschränkt. Vermutlich kann Succinat aufgrund

der strukturellen Flexibilität schlechter in der Bindetasche koordiniert werden. Andere C_4 -Dicarboxylate sind durch ihre Substituenten weniger beweglich und werden zusätzlich über Wechselwirkungen mit den polaren Seitengruppen stabilisiert.

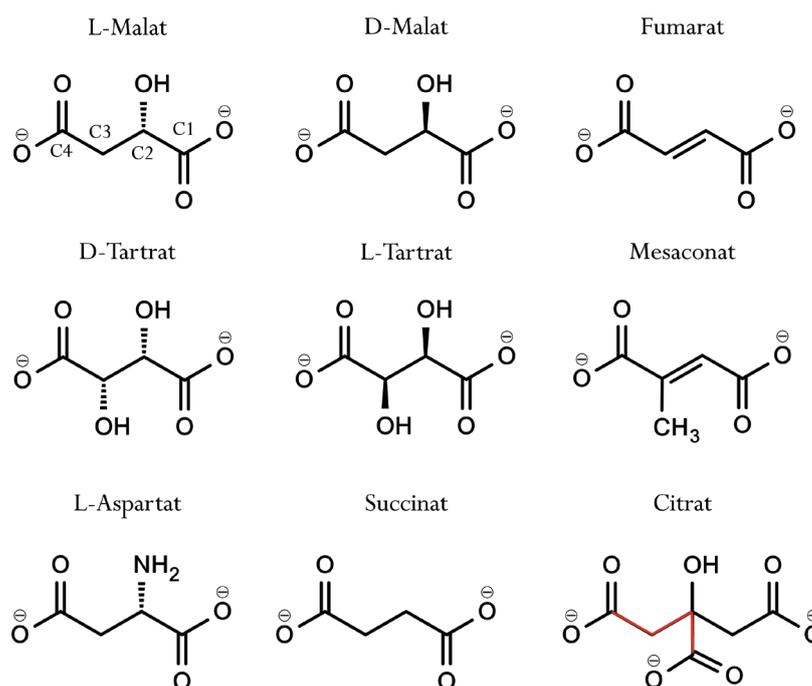


Abb. 27 Molekülstrukturen der verwendeten Effektoren. Die Substrate liegen unter physiologischen Bedingungen in deprotonierter Form vor und werden als Dianion oder Trianion (Citrat) von der Zelle aufgenommen. Die Moleküle unterscheiden sich bezüglich der Substituenten der C_4 -Kette und der Konfiguration am chiralen Zentrum C2. Citrat entspricht strukturell L-Malat mit Acetyl-Substituent (Rote Markierung). L-Malat aktivierte DcuS am stärksten und besitzt an C2 einen Hydroxyl-Substituenten in (S)-Konfiguration.

Die innerhalb des *Molekularen Dockings* (MD) kalkulierten Bindungen der anderen Substrate unterstützen die Vermutung, dass L-Malat aufgrund der Substituenten-Konfiguration das optimale Substrat für DcuS-PAS_p ist und dies die energetisch optimale Positionierung

des C₄-Dicarboxylat-Grundgerüsts ermöglicht. Succinat ist weder durch Seitengruppen noch durch eine C=C Doppelbindung in der Bewegung eingeschränkt. Die berechnete Koordination des Liganden entspricht deshalb aus energetischer Sicht der optimalen Positionierung eines C₄-Dicarboxylats ohne Substituent in der Bindetasche. Die Lage der Kohlenstoffkette ist kongruent mit der von L-Malat, andere Effektoren weichen von dieser Orientierung ab. Dies wird ebenfalls durch die Lage von Citrat in CitA-PAS_p gestützt. Betrachtet man Citrat als L-Malat mit zusätzlichem Acetyl-Substituent, so ist Citrat in der CitA-PAS_p-Domäne analog zu L-Malat in DcuS-PAS_p positioniert (Abb. 29A, B). In CitA ist die Acetyl-Gruppe in Richtung des Rests M122 orientiert, in DcuS wird die Ausdehnung des Moleküls durch den voluminösen Rest von Phenylalanin120 begrenzt. Weiterhin ermöglicht die Konfiguration von L-Malat die optimale Lage der substituierten OH-Gruppe. In der für D-Malat, D-Tartrat, L-Aspartat und Citrat berechneten Positionierung war die OH-Gruppe analog ausgerichtet. Die Moleküle waren jedoch stärker verdreht, was die Affinität von DcuS-PAS_p für die Substrate verringern würde. Die Wichtigkeit des OH-Substituenten und dessen Orientierung wurde bereits von Cheung und Hendrickson (2008) erkannt. Sie postulierten DcuS müsse für L-Malat stereospezifisch sein, da D-Malat aufgrund der räumlichen Ausrichtung des OH-Substituenten mit dem Rest Phenylalanin120 in sterischen Konflikt geriete. Die Bindung von L-Malat sollte zudem durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der aromatischen Seitenkette weiter begünstigt werden. In den *dcuB-lacZ* Expressionsstudien wurde DcuS_{wt} durch D-Malat jedoch in hohem Maße aktiviert. Die Variante DcuS-F120A erkannte Mesaconat, Citrat und L-Malat, aber keines der anderen C₄-Dicarboxylate. Entgegen der Annahme von Cheung und Hendrickson (2008) ist F120 auch für die Stabilisierung von (R)-konfigurierten C₄-Dicarboxylaten wie D-Malat wichtig. Allerdings besitzt DcuS zu den (S)-konfigurierten Substraten tatsächlich eine höhere Affinität, was vermutlich durch F120 mit beeinflusst wird. Cheung und Hendrickson (2008) sind wahrscheinlich von starren Molekülstrukturen ausgegangen.

Die mögliche Funktion von DcuS als L-Malat-Sensor wurde bereits in Krämer (2008)

diskutiert, da Citrat-spezifische DcuS-Varianten durch L-Malat aktiviert wurden. Zudem sind das *dcuSR*-Operon und die Gene für Fumarase (*fumB*) und DcuB (*dcuB*) ko-lokalisiert. DcuB transportiert L-Malat (neben anderen C₄-Dicarboxylaten) ins Zellinnere, Fumarase B wandelt L-Malat unter Wasserabspaltung in Fumarat um. Fumarase B kann ebenfalls D-Tartrat in Fumarat umwandeln und wird für das Wachstum auf D-Tartrat benötigt (Kim *et al.* 2007). Die (R)-konfigurierten Substrate D-Malat und L-Tartrat werden nicht erkannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Sonderstellung von L-Malat weiter. Der Effektor wurde mit einer Ausnahme von allen DcuS-Varianten erkannt und induzierte eine hohe Aktivität. Die Kenntnis der Affinitäten von DcuS für die Substrate wäre interessant, allerdings ist die experimentelle Bestimmung für L-Malat (und Fumarat) schwierig, da die Substrate schnell verstoffwechselt werden. Relativ hohe apparente K_D-Werte wurden für andere C₄-Dicarboxylate (0,5 - 3 mM) und Citrat (7 mM) gemessen (Kneuper *et al.* 2005). Da eine niedrige Dissoziationskonstante K_D Ausdruck für eine höhere Affinität eines Proteins zum Liganden ist, wird für DcuS und L-Malat ein K_D-Wert unterhalb von 0,5 mM erwartet.

Die genannten Kriterien der Substratwahl spielten in allen DcuS-Varianten eine Rolle. Einige selektierten jedoch stärker nach der chiralen Konfiguration an C2 und die Beschaffenheit der Substituenten wurde als Selektionsmerkmal weniger wichtig. In DcuS-F141S wurde die hydrophobe Aminosäure Phenylalanin gegen den polaren Rest Serin getauscht. F141 ist mit der Hauptkette an der Bindung von L-Malat beteiligt und befindet sich nahe dem gebundenen Substrat. Die an C2 (S)-konfigurierten Substrate L-Malat, D-Tartrat und L-Aspartat aktivierten die Variante stärker als D-Malat und L-Tartrat, welche (R)-konfiguriert sind. Da L-Malat und Fumarat von der Variante am besten erkannt wurden, wird die Substratspezifität der Variante vermutlich durch Konflikte des Serinrestes mit den (R)-konfigurierten Substituenten an C2 beeinflusst. Die Substituenten-Konfiguration von L-Malat ist optimal und die Kohlenstoffkette von Fumarat nicht substituiert. Die Varianten DcuS-T101G, DcuS-I125S, DcuS-Q159V

und DcuS-F149K hatten eine vergleichbare Substratspezifität, weshalb ein ähnlicher Mechanismus vermutet wird.

Andere Varianten selektierten bezüglich der Substituenten und deren chiraler Konfiguration so streng, dass L-Malat als einziges C₄-Dicarboxylat perzipiert wurde. Dazu zählen die Varianten DcuS-F120A, DcuS-F120M, DcuS-101G-F120M-I125S, DcuS-H110A und DcuS-R147A. Fumarat und Succinat wurden nicht erkannt, weshalb die polaren Interaktionen mit den endständigen COOH-Gruppen scheinbar nicht ausreichen um die Substrate zu koordinieren. Wie in Abschnitt 5.4.2 besprochen wird, fallen in den Varianten DcuS-H110A und DcuS-R147A H-Brücken weg, die an der Bindung der endständigen COOH-Gruppen beteiligt sind.

5.4.2 Andere C₄-Dicarboxylate werden von DcuS-PAS_p ähnlich wie L-Malat koordiniert

DcuS erkennt eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate (Kneuper *et al.* 2005). Die molekulare Grundstruktur der erkannten Moleküle entspricht dabei einem C₄-Dicarboxylat, dessen Kohlenstoffkette durch Seitengruppen substituiert wurde. Es stellte sich die Frage, ob die breite Substratspezifität von DcuS im Zusammenhang mit strukturellen Veränderungen der PAS_p-Domäne steht oder andere Effektoren ebenfalls in der L-Malat-Konformation koordiniert werden. In *dcuB-lacZ* Expressionsstudien wurde die Aktivierung von DcuS-Varianten gemessen, in denen durch Aminosäureaustausche an der Koordination von L-Malat beteiligte H-Brücken entfernt wurden. Wird die Affinität der Varianten für einen Effektor dadurch reduziert, ist dessen Bindung durch den entsprechenden Rest wahrscheinlich. Ergänzend dazu wurde in Rezeptor-Liganden-Studien auf chemoinformatischem Wege überprüft, ob DcuS-PAS_p in der L-Malat-Konformation befähigt ist andere Substrate in sinnvoller Positionierung zu binden und mit welchen Resten H-Brücken ausgebildet werden können. Die Ergebnisse deuten auf eine zu L-Malat analoge Koordination der Substrate hin.

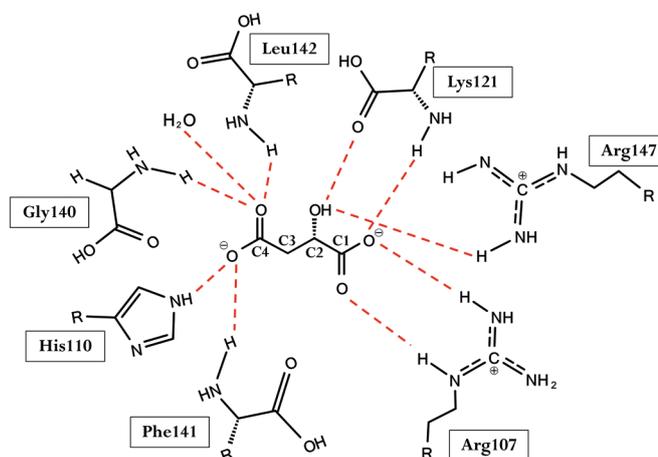


Abb. 28: Koordination von L-Malat durch DcuS-PAS_p. Die Struktur von DcuS-PAS_p mit gebundenem L-Malat wurde von Cheung und Hendrickson (2008) röntgenspektroskopisch gelöst. Die Reste R107, H110 und R147 koordinieren L-Malat mit den Seitenketten, die Reste K121, G140, F141 und L142 mit der Hauptkette. Die COOH-Gruppe an C1 wird hauptsächlich durch R107 in der Bindetasche stabilisiert.

L-Malat bildet mit polaren Gruppen der Seitenketten und Hauptketten von Aminosäuren H-Brücken aus, die das Molekül in der Bindetasche stabilisieren (Abb. 28). Die Reste R107, H110 und R147, welche L-Malat mit der Seitenkette koordinieren, wurden durch die aliphatische Aminosäure Alanin ersetzt, was zum Wegfall der entsprechenden H-Brücke führt. Die Varianten erkannten ausschließlich L-Malat (DcuS-H110A, DcuS-R147A) oder kein Substrat (DcuS-R107A), obwohl DcuS_{Wt} durch die anderen Effektoren auf hohem Niveau aktiviert wurde. Da die getesteten Substrate durch die Varianten nicht mehr wahrgenommen wurden, ist eine Beteiligung der Reste R107, H110 und R147 an der Koordination der Effektoren wahrscheinlich. Die fehlende Affinität von DcuS-R107A wird verständlich, wenn man die Koordination von L-Malat in DcuS-PAS_p betrachtet (Abb. 28). Die beiden COOH-Gruppen werden unter anderem durch die Reste H110 und R107

koordiniert, wobei R107 eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der proximalen COOH-Gruppe einnimmt. Die distale COOH-Gruppe wird durch fünf H-Brücken und vier Aminosäurereste gebunden, während die COOH-Gruppe an C1 lediglich durch drei H-Brücken und zwei Reste koordiniert ist. In DcuS-R107 wird die C1-Seite des Moleküls nur durch eine H-Brücke ausgehend von K121 in der Tasche gehalten, was für die Stabilisierung offensichtlich nicht mehr ausreicht. Die maßgebliche Beteiligung der Reste R107 und H110 an der Bindung von C_4 -Dicarboxylaten und Citrat wurde bereits in Krämer *et al.* (2007) diskutiert. Mit Kenntnis des genauen Bindungsmodus von L-Malat ist es nun sehr wahrscheinlich, dass die endständigen COOH-Gruppen der Substrate jeweils über H110 und R107 gebunden werden und die Moleküle innerhalb der Bindetasche ähnlich orientiert sind.

Dies wird zusätzlich durch die Ergebnisse der *Molekularen Docking*-Studie (MD) untermauert, in der die wahrscheinlichsten Bindungsmodi innerhalb der L-Malat-Konformation von DcuS kalkuliert wurden (Abb. 25). Tatsächlich wurden die Carboxylat-Gruppen an C1 und C4 fast immer durch R107 und H110 gebunden. Nur bei D-Tartrat war die Lokalisation der C1-COOH-Gruppe und des OH-Substituenten vertauscht und Fumarat bildete keine H-Brücke mit H110 aus. Citrat wurde wie ein C_4 -Dicarboxylat koordiniert, bei der die mittlere COOH-Gruppe dem C1-Atom von L-Malat entsprach (Abb. 29C). Die endständigen Carboxylat-Gruppen des C_4 -Dicarboxylat-Teils wurden von R107 und H110 gebunden, die OH-Gruppe war wie in L-Malat orientiert und bildete eine H-Brücke mit R147 aus. Dies entspricht der von Krämer *et al.* (2007) vermuteten Citratbindung, bei der die Bindung des Moleküls als L-Malat mit zusätzlicher Acetyl-Gruppe vorgeschlagen wurde. Im Vergleich zu CitA ist die Ausdehnung des Acetyl-Rests in DcuS durch F120 behindert (Abb. 29B), welcher in der berechneten Positionierung die distale COOH-Gruppe des L-Malat-Teils seitlich verdrängt. Interessanterweise führte der Austausch von Phenylalanin120 gegen Methionin aus CitA (DcuS-F120M) nicht zu einer höheren Affinität für Citrat. Allerdings entsteht durch den Austausch des Restes

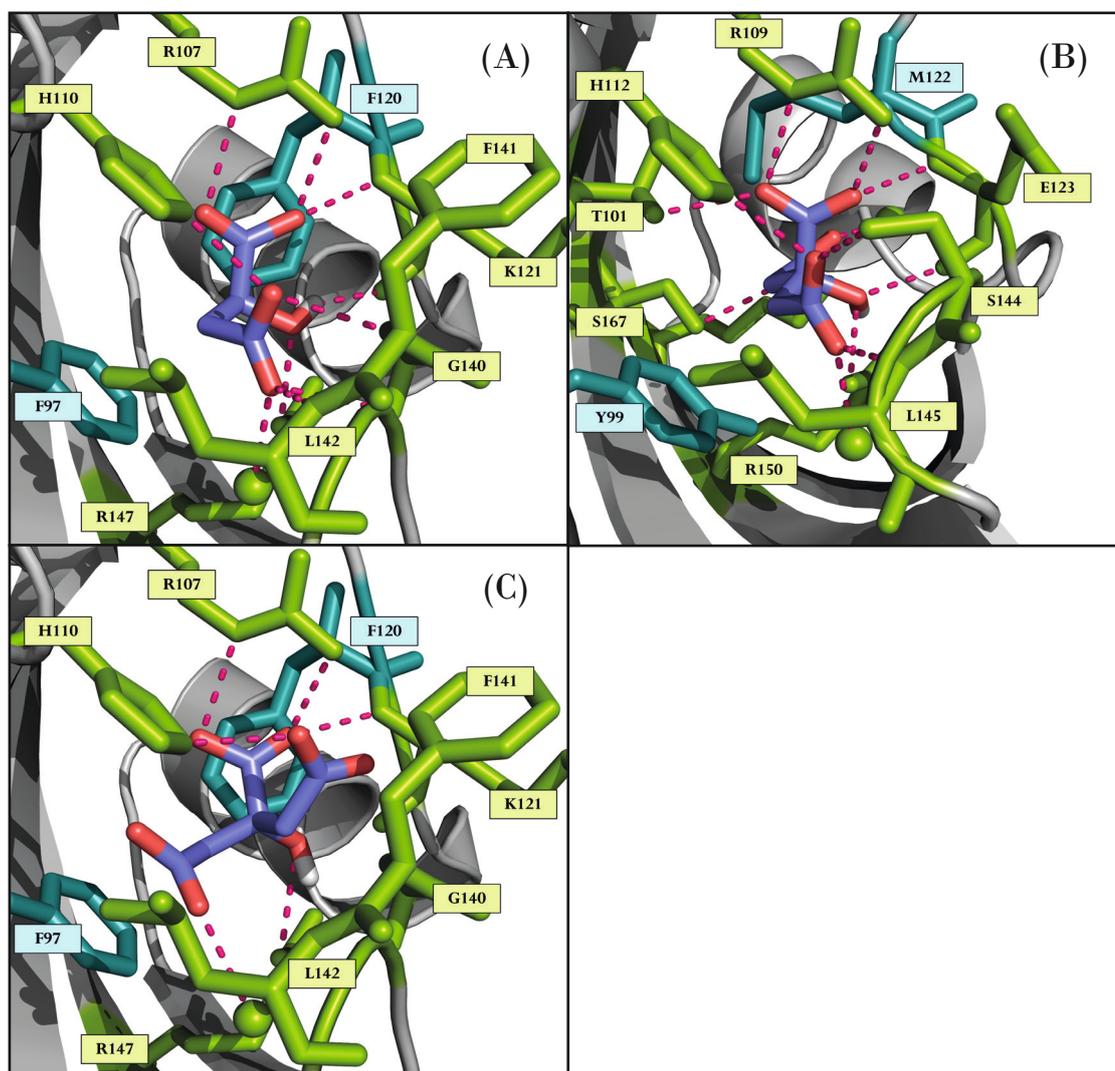


Abb. 29: Positionierung von L-Malat und Citrat in DcuS und Citrat in CitA. (A) Struktur von DcuS-PAS_p mit koordiniertem L-Malat (Cheung und Hendrickson 2008). (B) Struktur von CitA-PAS_p mit koordiniertem Citrat (Sevvana et al. 2008). (C) Wahrscheinliche Positionierung von Citrat in DcuS-PAS_p, berechnet mit der Software *Autodock Vina* (Trott et al. 2010). Pink = Wasserstoffbrücken. Visualisierung in *PyMOL 1.3*. (Eine größere Version von (A) und (B) befindet sich in Anhang A.3)

nicht zwangsläufig die exakte CitA-Struktur, da die Reste nicht starr sind und sich die PAS_p-Domänen nicht vollständig entsprechen.

Glutarat wird durch DcuS nicht gebunden und entspricht Citrat ohne die mittlere COOH- und OH-Gruppe (Krämer *et al.* 2007). Die fehlende Affinität für Glutarat kann über die

berechnete Positionierung von Citrat erklärt werden und unterstützt dessen Plausibilität. Aufgrund des Rests F120 hat die ausgestreckte C5-Kette in DcuS-PAS_p keinen Platz. Da die mittleren Substituenten von Citrat eine maßgebliche Rolle bei dessen Bindung spielen, kann Glutarat nicht ausreichend stabilisiert werden.

Wurden Aminosäuren ausgetauscht, die L-Malat an der Hauptkette binden (DcuS-K121A, DcuS-F141S), wurde die Substratspezifität von DcuS in geringerem Maße beeinflusst. Vermutlich ist die Ausbildung von H-Brücken mit den Resten nicht gestört. Die Spezifität von DcuS kann jedoch durch geänderte chemische Eigenschaften der Reste oder sterische Konflikte beeinflusst werden. Die Aktivität von DcuS-K121A war mit allen Effektoren erhöht und die von DcuS-F141S reduziert. Aufgrund der geringeren Ausdehnung des Alanin Rests gegenüber Lysin (DcuS-K121A) könnten die Substrate näher an der Hauptkette sein, wodurch die Energie der H-Brücken steigt. In Variante DcuS-F141S wurde die hydrophobe Aminosäure Phenylalanin gegen den polaren Rest von Serin getauscht. Wie im vorigen Kapitel ausgeführt, wird die veränderte Substratspezifität durch Konflikte des C2-Substituenten mit dem Serin Rest verursacht.

Die Substratspezifität von DcuS-H110A und DcuS-R147A zeigt erneut die Optimierung der DcuS-PAS_p-Domäne für L-Malat. Da die Affinität der Varianten zu den anderen Effektoren (nicht aber zu L-Malat) nicht nur reduziert war sondern gänzlich fehlte, kann die veränderte Substratspezifität nicht allein mit Wegfall der H-Brücke erklärt werden und muss ebenfalls durch strukturelle Gegebenheiten der PAS_p-Domäne verursacht werden, welche die Bindung von L-Malat gegenüber Substraten mit ausgetauschtem Substituent (L-Aspartat) oder anderer chiraler Konfiguration (D-Malat) begünstigen. Es wird ebenfalls deutlich, dass MD und die Methodik, Bindungsmodi über Aminosäure Austausch herzuleiten, von vereinfachenden Annahmen ausgehen und nicht ausreichen um die breite Substratspezifität von DcuS abschließend zu erklären. So ist R147 im wahrscheinlichsten errechneten Bindungsmodus für Succinat und Mesaconat nicht an der Bindung beteiligt, obwohl die Substrate von DcuS-R147A nicht erkannt wurden. In

MD wird die Komplexität der Wechselwirkungen vereinfacht bzw. die Beweglichkeit des Rezeptors außer acht gelassen, gleichfalls wird angenommen, dass die DcuS-PAS_p-Struktur durch die Aminosäureaustausche nicht beeinflusst wird und geänderte Substratspezifitäten nicht auf sekundäre Effekte zurückzuführen sind. Beide Methoden gehen also von einer nahezu statischen PAS_p-Domäne aus. Zudem können für die Bindung essentielle Reste rein strukturell an der Koordination von Substraten beteiligt sein, unabhängig davon, ob sie mit diesen direkt wechselwirken.

Die Ergebnisse sprechen jedoch dafür, dass die Konformation der PAS_p-Domäne durch die Austausch nicht entscheidend geändert wurde und andere Substrate homolog zu L-Malat gebunden werden. Da L-Malat in allen erzeugten Varianten ein gutes Substrat war, selektierten die Varianten nach den gleichen Kriterien. Die grundsätzliche PAS_p-Struktur war demnach in den Varianten ähnlich. Die in DcuS-PAS_p konservierten Aminosäuren sind an der Bindung von L-Malat beteiligt oder liegen weit außerhalb der Bindetasche (Krämer *et al.* 2007; Cheung und Hendrickson 2008). Es ist unwahrscheinlich, dass DcuS-PAS_p eine alternative Konformation ausbildet in der Reste ohne Konservierung die Substratbindung bewerkstelligen. Desweiteren besitzen die anderen Effektoren eine zu L-Malat ähnliche Struktur, weshalb eine vergleichbare Positionierung und Bindung in der L-Malat-Konformation von DcuS-PAS_p plausibel ist.

Mit aktuellen Algorithmen ist es nicht möglich die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand fehlerfrei abzubilden, jedoch kann die Probabilität der Ergebnisse durch die Kenntnis gewisser Variablen gesteigert werden. *Molekulares Docking* (MD) wird verwendet, um die energetisch günstigste Positionierung eines Liganden innerhalb einer makromolekularen Struktur (Rezeptor) zu berechnen. „Positionierung“ schließt dabei die Orientierung relativ zum Rezeptor, sowie die Konformation des Liganden mit ein. Es existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Softwares, welche bei der Berechnung andere Schwerpunkte setzen (Meng *et al.* 2011). Die Eignung der Programme hängt von der Fragestellung ab (Cross *et al.* 2009). Die verwendete Software *Autodock Vina* (Trott *et al.* 2010) ist weit

verbreitet und wurde mit der Positionierung von L-Malat in DcuS-PAS_p als Positivkontrolle getestet. Da es sich bei Rezeptor und Ligand um bewegliche Strukturen handelt deren Interaktion zusätzlich durch das Lösungsmittel beeinflusst wird, werden die komplexen Wechselwirkungen näherungsweise in Algorithmen vereinfacht. Die Kalkulation absoluter Affinitäten ist mit gegenwärtig verfügbarer Software nicht möglich, allerdings können unterschiedliche Positionierungen aufgrund relativer Bindungsenergien nach ihrer Probabilität geordnet werden (Gilson und Zhou 2007). Als wahrscheinlichste Positionierung gelten Ergebnisse, bei denen die Bindungsenergie maximal und die Verdrehung des Liganden minimal sind. Es gibt verschiedentlich experimentell gestützte Hinweise, dass für Rezeptoren und Liganden nicht immer eine dominante Konformation gültig ist und ähnliche Bindungsmodi nebeneinander existieren (Mobley und Dill 2009). Bei der Kalkulation von Affinitäten liegt der größte Unsicherheitsfaktor in der korrekten Berechnung der flexiblen Rezeptorstruktur (Totrov und Abagyan 2008; Lee *et al.* 2012). Die Genauigkeit von Rezeptor-Liganden-Studien ist deshalb signifikant erhöht, wenn, wie im Falle von DcuS, die Konformation des Rezeptors mit einem gebundenen Substrat bekannt ist (*cognate-receptor docking*) und damit zudem der Bereich der Ligandenbindung definiert werden kann (Lee *et al.* 2012). Zudem handelt es sich bei den C₄-Dicarboxylaten um relativ einfache Liganden mit wenigen Freiheitsgraden (Mobley und Dill 2009; Slowoski *et al.* 2014). Die Rezeptor-Liganden-Interaktion hängt ebenfalls vom Protonierungsstatus des Liganden ab, weshalb dessen Kenntnis sich positiv auf die Korrektheit der Ergebnisse auswirkt. Die Protonierung eines Liganden kann innerhalb des Lösungsmittels und bei Rezeptorbindung unterschiedlich sein, wenn dieser durch lokale pKa-Werte von Aminosäuren in der Bindetasche beeinflusst wird (Mobley und Dill 2009). Die verwendeten Substrate liegen bei physiologischem pH-Wert zweifach oder dreifach (Citrat) deprotoniert vor. L-Malat wird in der zweifach deprotonierten Form gebunden, weshalb die anderen Substrate vermutlich ebenfalls als Dianion (Trianion) gebunden werden.

Anhand der Kalkulationen für L-Aspartat und Succinat wird deutlich, dass die reale

Affinität eines Rezeptors zu einem Substrat nicht allein an der berechneten Affinität bzw. der reinen Anzahl an H-Brücken festgemacht werden kann. Succinat aktivierte DcuS in den *dcuB-lacZ*-Expressionsstudien am schlechtesten, die mit *Autodock Vina* berechnete theoretische Affinität (Anhang A.2) war fast so hoch wie die für L-Malat (L-Malat: 6,4 kcal/mol, Succinat: 6 kcal/mol). L-Aspartat ist analog zu L-Malat positioniert und bildet die gleiche Anzahl an H-Brücken aus. In molekularem Docking wird die maximale Bindungsenergie berechnet, die unter Einbeziehung von Coulomb und van der Waals Interaktionen bzw. repulsiven Kräften und einem beweglichen Liganden möglich ist (Gilson *et al.* 2007; Sulimov *et al.* 2017). Die nötige Verdrehung der Molekülstruktur wird ausgewertet, geht jedoch nicht in die Affinität mit ein. Handelt es sich um Moleküle mit vielen Freiheitsgraden wie Succinat, kann die wahrscheinlichste Positionierung einer großen freien Energie entsprechen, obwohl das Substrat aufgrund dessen Flexibilität vom Rezeptor nicht stabil gebunden werden kann. Ebenso kann die Affinität für L-Aspartat nicht anhand der Anzahl von H-Brücken hergeleitet werden, da deren Energie stark variieren kann und schwer zu berechnen ist (Wendler *et al.* 2010). Die Energie von H-Brücken bewegt sich im Bereich von 2 kJ/mol bis 161,5 kJ/mol und wird in starke, mittlere und schwache Bindungen eingeteilt (Emsley 1980; Jeffrey 1997). Neben den Bindungspartnern beeinflussen der Abstand und Winkel die H-Brücke (Jeffrey 1997). Die Energie einer H-Brücke kann sowohl bei den gleichen atomaren Partnern als auch bei den gleichem makromolekularen Molekülen unterschiedlich sein (Grunenberg 2004).

5.5 Ausblick

In Jausch *et al.* (2002) wurde ein *in vitro* Testsystem etabliert, in dem die Funktionsweise der Sensorkinase DcuS und des Responseregulator DcuR unter definierten Bedingungen untersucht werden kann. In dieser Arbeit wurde die Grundlage für ein funktionales *in vitro* DcuS/DctA-Testsystem geschaffen, bei dem das System von Jausch *et al.* (2002) um die

Komponente des Ko-Regulators DctA erweitert wurde. In ersten Experimenten wurde ein hemmender Einfluss von rekonstituiertem DctA auf die Phosphorylierung von DcuS mit und ohne Fumarat gezeigt. Sowohl der DctA- als auch der Fumarat-Effekt variierten in ihrer Ausprägung, weshalb weitere Untersuchungen des Systems nötig sind. Vordergründig muss die Aktivität von rekonstituiertem eCFP-DctA in Transportmessungen bestimmt und der Nachweis erbracht werden, dass die Hemmung auf regulatorische Einflüsse von DctA zurückzuführen ist. Entsprechende Versuche sind in 5.3.3 im Detail erläutert. In zukünftigen Experimenten ist es vorstellbar die Phosphatasefunktion innerhalb des DcuSR-Systems zu untersuchen. Experimente dazu wurden bereits von Janausch *et al.* (2002) und Krämer (2008) durchgeführt, in denen eine intrinsische Phosphatasefunktion von DcuR gefunden wurde und DcuS die Dephosphorylierung von DcuR weiter stimulierte. Es ist denkbar, dass das Verhalten von DcuS im DcuS/DctA-Komplex hinsichtlich der Phosphatasefunktion moduliert wird.

Die im Rahmen der *dcuB-lacZ*-Expressionsstudien und des Molekularen Docking gewonnenen Ergebnisse zeigten die Optimierung von DcuS für L-Malat, was dessen bereits diskutierte Funktion (Krämer 2008) als L-Malat Sensor wahrscheinlich macht. Die Erkenntnisse bieten einen Erklärungsansatz für das Vermögen von DcuS die unterschiedlichen C₄-Dicarboxylate zu erkennen und lassen eine analoge Positionierung dieser innerhalb der L-Malat-Konfiguration von DcuS-PAS_p vermuten. Hier wäre die experimentelle Bestimmung absoluter Affinitäten von DcuS für die Substrate interessant. Die Generierung von DcuS-Kristallen mit gebundenen Substraten um diese strukturell analysieren zu können wäre aufschlussreich, ist jedoch schwierig zu realisieren.

6 Literatur

- Abo-Amer, Aly E.; Munn, Jonathan; Jackson, Kerry; Aktas, Murat; Golby, Paul; Kelly, David J.; Andrews, Simon C. (2004): DNA interaction and phosphotransfer of the C4-dicarboxylate-responsive DcuS-DcuR two-component regulatory system from *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 186 (6), S. 1879–1889.
- Arai, R.; Ueda, H.; Kitayama, A.; Kamiya, N.; Nagamune, T. (2001): Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. In: *Protein engineering* 14 (8), S. 529–532.
- Bannwarth, Michael; Schulz, Georg E. (2003): The expression of outer membrane proteins for crystallization. In: *Biochimica et biophysica acta* 1610 (1), S. 37–45.
- Bauer, J. (2010): The C4-Dicarboxylate Carriers DcuB and DctA of *Escherichia coli*: Function as Cosensors and topology. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H. et al. (2000): The Protein Data Bank. In: *Nucleic acids research* 28 (1), S. 235–242.
- BERTANI, G. (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 62 (3), S. 293–300.
- Bittner, Lisa-Marie; Arends, Jan; Narberhaus, Franz (2016): Mini review: ATP-dependent proteases in bacteria. In: *Biopolymers* 105 (8), S. 505–517. DOI: 10.1002/bip.22831.
- Boratyn, Grzegorz M.; Camacho, Christiam; Cooper, Peter S.; Coulouris, George; Fong, Amelia; Ma, Ning et al. (2013): BLAST: a more efficient report with usability improvements. In: *Nucleic acids research* 41 (Web Server issue), W29-33. DOI: 10.1093/nar/gkt282.
- Borgstahl, G. E.; Williams, D. R.; Getzoff, E. D. (1995): 1.4 Å structure of photoactive yellow protein, a cytosolic photoreceptor: unusual fold, active site, and chromophore. In: *Biochemistry* 34 (19), S. 6278–6287.
- Bott, M.; Meyer, M.; Dimroth, P. (1995): Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. In: *Molecular microbiology* 18 (3), S. 533–546.
- Buelow, Daelynn R.; Raivio, Tracy L. (2010): Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. In: *Molecular microbiology* 75 (3), S. 547–566. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06982.x.
- Bueno, Emilio; Mesa, Socorro; Bedmar, Eulogio J.; Richardson, David J.; Delgado, Maria J. (2012): Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control. In: *Antioxidants & redox signaling* 16 (8), S. 819–852. DOI: 10.1089/ars.2011.4051.
- Chang, Changsoo; Tesar, Christine; Gu, Minyi; Babnigg, Gyorgy; Joachimiak, Andrzej; Pokkuluri, P. Raj et al. (2010): Extracytoplasmic PAS-like domains are common in signal transduction proteins. In: *Journal of bacteriology* 192 (4), S. 1156–1159. DOI: 10.1128/JB.01508-09.
- Chen, Xiaoying; Zaro, Jennica L.; Shen, Wei-Chiang (2013): Fusion protein linkers: property, design and functionality. In: *Advanced drug delivery reviews* 65 (10), S. 1357–1369. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.039.
- Cheung, Jonah; Hendrickson, Wayne A. (2008): Crystal structures of C4-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (44), S. 30256–30265. DOI: 10.1074/jbc.M805253200.
- Cock, Peter J. A.; Whitworth, David E. (2007): Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions. In: *Molecular biology and evolution* 24 (11), S. 2355–2357. DOI: 10.1093/molbev/msm170.
- Cross, Jason B.; Thompson, David C.; Rai, Brajesh K.; Baber, J. Christian; Fan, Kristi Yi; Hu, Yongbo; Humblet, Christine (2009): Comparison of several molecular docking programs: pose prediction and virtual screening accuracy. In: *Journal of chemical information and modeling* 49 (6), S. 1455–1474. DOI: 10.1021/ci900056c.

6 Literatur

- Cubitt, Andrew B.; Heim, Roger; Adams, Stephen R.; Boyd, Aileen E.; Gross, Larry A.; Tsien, Roger Y. (1995): Understanding, improving and using green fluorescent proteins. In: *Trends in biochemical sciences* 20 (11), S. 448–455. DOI: 10.1016/S0968-0004(00)89099-4.
- Davies, S. J.; Golby, P.; Omrani, D.; Broad, S. A.; Harrington, V. L.; Guest, J. R. et al. (1999): Inactivation and regulation of the aerobic C(4)-dicarboxylate transport (dctA) gene of *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 181 (18), S. 5624–5635.
- Deutscher, Josef; Francke, Christof; Postma, Pieter W. (2006): How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. In: *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 70 (4), S. 939–1031. DOI: 10.1128/MMBR.00024-06.
- Dong, H.; Nilsson, L.; Kurland, C. G. (1995): Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. In: *Journal of bacteriology* 177 (6), S. 1497–1504.
- Dower, W. J.; Miller, J. F.; Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. In: *Nucleic acids research* 16 (13), S. 6127–6145.
- Drew, David; Newstead, Simon; Sonoda, Yo; Kim, Hyun; Heijne, Gunnar von; Iwata, So (2008): GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Nature protocols* 3 (5), S. 784–798. DOI: 10.1038/nprot.2008.44.
- Duquesne, Katia; Prima, Valerie; Sturgis, James N. (2016): Membrane Protein Solubilization and Composition of Protein Detergent Complexes. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1432, S. 243–260. DOI: 10.1007/978-1-4939-3637-3_15.
- Emsley, J. (1980): Very strong hydrogen bonding. In: *Chem. Soc. Rev.* 9 (1), S. 91. DOI: 10.1039/cs9800900091.
- Engel, P.; Kramer, 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. In: *Journal of bacteriology* 174 (17), S. 5533–5539.
- Engel, P.; Kramer, R.; Unden, G. (1994): Transport of C4-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*. Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 222 (2), S. 605–614.
- Etzkorn, Manuel; Kneuper, Holger; Dunnwald, Pia; Vijayan, Vinesh; Kramer, Jens; Griesinger, Christian et al. (2008): Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS. In: *Nature structural & molecular biology* 15 (10), S. 1031–1039. DOI: 10.1038/nsmb.1493.
- Evanics, Ferenc; Hwang, Peter M.; Cheng, Yao; Kay, Lewis E.; Prosser, R. Scott (2006): Topology of an outer-membrane enzyme: Measuring oxygen and water contacts in solution NMR studies of PagP. In: *Journal of the American Chemical Society* 128 (25), S. 8256–8264. DOI: 10.1021/ja0610075.
- Fritz, Georg; Dintner, Sebastian; Treichel, Nicole Simone; Radeck, Jara; Gerland, Ulrich; Mascher, Thorsten; Gebhard, Susanne (2015): A New Way of Sensing: Need-Based Activation of Antibiotic Resistance by a Flux-Sensing Mechanism. In: *mBio* 6 (4), e00975. DOI: 10.1128/mBio.00975-15.
- Gasteiger, Elisabeth; Gattiker, Alexandre; Hoogland, Christine; Ivanyi, Ivan; Appel, Ron D.; Bairoch, Amos (2003): ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. In: *Nucleic acids research* 31 (13), S. 3784–3788.
- Gebhard, Susanne; Mascher, Thorsten (2011): Antimicrobial peptide sensing and detoxification modules: unravelling the regulatory circuitry of *Staphylococcus aureus*. In: *Molecular microbiology* 81 (3), S. 581–587. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07747.x.
- Geertsma, Eric R.; Groeneveld, Maarten; Slotboom, Dirk-Jan; Poolman, Bert (2008): Quality control of overexpressed membrane proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (15), S. 5722–5727. DOI: 10.1073/pnas.0802190105.
- Geertsma, Eric R.; Nik Mahmood, N A B; Schuurman-Wolters, Gea K.; Poolman, Bert (2008): Membrane reconstitution of ABC transporters and assays of translocator function. In: *Nature protocols* 3 (2), S. 256–266. DOI: 10.1038/nprot.2007.519.

- Gendreau, Sandra; Voswinkel, Stephan; Torres-Salazar, Delany; Lang, Niklas; Heidtmann, Hannelore; Detro-Dassen, Silvia et al. (2004): A trimeric quaternary structure is conserved in bacterial and human glutamate transporters. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (38), S. 39505–39512. DOI: 10.1074/jbc.M408038200.
- George A. Jeffrey (1997): *An Introduction to Hydrogen Bonding*. New York, NY: Oxford University Press.
- Giacalone, Matthew J.; Gentile, Angela M.; Lovitt, Brian T.; Berkley, Neil L.; Gunderson, Carl W.; Surber, Mark W. (2006): Toxic protein expression in *Escherichia coli* using a rhamnose-based tightly regulated and tunable promoter system. In: *BioTechniques* 40 (3), S. 355–364.
- Gilson, Michael K.; Zhou, Huan-Xiang (2007): Calculation of protein-ligand binding affinities. In: *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 36, S. 21–42. DOI: 10.1146/annurev.biophys.36.040306.132550.
- 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 C4-dicarboxylates in *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 181 (4), S. 1238–1248.
- Goujon, Mickael; McWilliam, Hamish; Li, Weizhong; Valentin, Franck; Squizzato, Silvano; Paern, Juri; Lopez, Rodrigo (2010): A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. In: *Nucleic acids research* 38 (Web Server issue), W695-9. DOI: 10.1093/nar/gkq313.
- Groeneveld, Maarten; Slotboom, Dirk-Jan (2010): Na(+):aspartate coupling stoichiometry in the glutamate transporter homologue Glt(Ph). In: *Biochemistry* 49 (17), S. 3511–3513. DOI: 10.1021/bi100430s.
- Groeneveld, Maarten; Weme, Ruud G J Detert Oude; Duurkens, Ria H.; Slotboom, Dirk Jan (2010): Biochemical characterization of the C4-dicarboxylate transporter DctA from *Bacillus subtilis*. In: *Journal of bacteriology* 192 (11), S. 2900–2907. DOI: 10.1128/JB.00136-10.
- Grunenberg, Jorg (2004): Direct assessment of interresidue forces in Watson-Crick base pairs using theoretical compliance constants. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (50), S. 16310–16311. DOI: 10.1021/ja046282a.
- Gu, Y. Z.; Hogenesch, J. B.; Bradfield, C. A. (2000): The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 40, S. 519–561. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.519.
- Gubellini, Francesca; Verdon, Gregory; Karpowich, Nathan K.; Luff, Jon D.; Boel, Gregory; Gauthier, Nils et al. (2011): Physiological response to membrane protein overexpression in *E. coli*. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10 (10), M111.007930. DOI: 10.1074/mcp.M111.007930.
- Gul, Nadia; Linares, Daniel M.; Ho, Franz Y.; Poolman, Bert (2014): Evolved *Escherichia coli* strains for amplified, functional expression of membrane proteins. In: *Journal of molecular biology* 426 (1), S. 136–149. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.09.009.
- Gunsalus, R. P. (1992): Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes. In: *Journal of bacteriology* 174 (22), S. 7069–7074.
- Gutowski, S. J.; Rosenberg, H. (1975): Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K12. In: *The Biochemical journal* 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. In: *Journal of bacteriology* 177 (14), S. 4121–4130.
- Hammes, Gordon G. (2002): Multiple conformational changes in enzyme catalysis. In: *Biochemistry* 41 (26), S. 8221–8228.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Journal of molecular biology* 166 (4), S. 557–580.
- Hari, Sanjay B.; Sauer, Robert T. (2016): The AAA+ FtsH Protease Degrades an *ssrA*-Tagged Model Protein in the Inner Membrane of *Escherichia coli*. In: *Biochemistry* 55 (40), S. 5649–5652. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00920.
- Hattab, Georges; Suisse, Annabelle Y. T.; Ilioaia, Oana; Casiraghi, Marina; Dezi, Manuela; Warnet, Xavier L. et al.

6 Literatur

(2014): Membrane Protein Production in *Escherichia coli*: Overview and Protocols. In: Isabelle Mus-Veteau (Hg.): Membrane Proteins Production for Structural Analysis. New York, NY: Springer New York, S. 87–106.

Heginbotham, L.; Odessey, E.; Miller, C. (1997): Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K⁺ channel. In: *Biochemistry* 36 (33), S. 10335–10342. DOI: 10.1021/bi970988i.

Heim, R.; Tsien, R. Y. (1996): Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. In: *Current biology : CB* 6 (2), S. 178–182.

Herman, Christophe; Prakash, Sumit; Lu, Chi Zen; Matouschek, Andreas; Gross, Carol A. (2003): Lack of a robust unfoldase activity confers a unique level of substrate specificity to the universal AAA protease FtsH. In: *Molecular cell* 11 (3), S. 659–669.

Holloway, P. W. (1973): A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. In: *Analytical biochemistry* 53 (1), S. 304–308.

Hwang, Peter M.; Choy, Wing-Yiu; Lo, Eileen I.; Chen, Lu; Forman-Kay, Julie D.; Raetz, Christian R. H. et al. (2002): Solution structure and dynamics of the outer membrane enzyme PagP by NMR. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (21), S. 13560–13565. DOI: 10.1073/pnas.212344499.

Imamoto, Yasushi; Kataoka, Mikio (2007): Structure and photoreaction of photoactive yellow protein, a structural prototype of the PAS domain superfamily. In: *Photochemistry and photobiology* 83 (1), S. 40–49. DOI: 10.1562/2006-02-28-IR-827.

Island, M. D.; Kadner, R. J. (1993): Interplay between the membrane-associated UhpB and UhpC regulatory proteins. In: *Journal of bacteriology* 175 (16), S. 5028–5034.

Iuchi, S.; Lin, E. C. (1992): Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 174 (17), S. 5617–5623.

Jahn, Thomas R.; Radford, Sheena E. (2005): The Yin and Yang of protein folding. In: *The FEBS journal* 272 (23), S. 5962–5970. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.05021.x.

Janausch; Unden (1999): The *dcuD* (former *yhcl*) gene product of *Escherichia coli* as a member of the DcuC family of C4-dicarboxylate carriers: lack of evident expression. In: *Archives of microbiology* 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. In: *Archives of microbiology* 176 (3), S. 224–230.

Janausch, I. G.; Zientz, E.; Tran, Q. H.; Kroger, A.; Unden, G. (2002): C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. In: *Biochimica et biophysica acta* 1553 (1-2), S. 39–56.

Janausch, Ingo G.; Garcia-Moreno, Inma; Unden, Gottfried (2002): Function of DcuS from *Escherichia coli* as a fumarate-stimulated histidine protein kinase in vitro. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (42), S. 39809–39814. DOI: 10.1074/jbc.M204482200.

Jung, K.; Tjaden, B.; Altendorf, K. (1997): Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (16), S. 10847–10852.

Kallenberg, Felix; Dintner, Sebastian; Schmitz, Roland; Gebhard, Susanne (2013): Identification of regions important for resistance and signalling within the antimicrobial peptide transporter BceAB of *Bacillus subtilis*. In: *Journal of bacteriology* 195 (14), S. 3287–3297. DOI: 10.1128/JB.00419-13.

Karinou, Eleni; Compton, Emma L. R.; Morel, Melanie; Javelle, Arnaud (2013): The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C(4)-dicarboxylic acid transporter. In: *Molecular microbiology* 87 (3), S. 623–640. DOI: 10.1111/mmi.12120.

Kaspar, Sibylle; Perozzo, Remo; Reinelt, Stefan; Meyer, Margareta; Pfister, Karin; Scapozza, Leonardo; Bott, Michael (1999): The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. In: *Mol Microbiol* 33 (4), S. 858–872. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01536.x.

Kawate, Toshimitsu; Gouaux, Eric (2006): Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. In: *Structure (London, England : 1993)* 14 (4), S. 673–

681. DOI: 10.1016/j.str.2006.01.013.

Kay, W. W.; Kornberg, H. L. (1971): The uptake of C4-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 18 (2), S. 274–281.

Kibbe, Warren A. (2007): OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. In: *Nucleic acids research* 35 (Web Server issue), W43-6. DOI: 10.1093/nar/gkm234.

Kiefer, Hans (2003): In vitro folding of alpha-helical membrane proteins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1610 (1), S. 57–62.

Kihara, A.; Akiyama, Y.; Ito, K. (1999): Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. In: *The EMBO journal* 18 (11), S. 2970–2981. DOI: 10.1093/emboj/18.11.2970.

Kim, Ok Bin; Uden, Gottfried (2007): The L-tartrate/succinate antiporter TtdT (YgjE) of L-tartrate fermentation in *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 189 (5), S. 1597–1603. DOI: 10.1128/JB.01402-06.

Kleefeld, Alexandra; Ackermann, Bianca; Bauer, Julia; Krämer, Jens; Uden, Gottfried (2009): The fumarate/succinate antiporter DcuB of *Escherichia coli* is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (1), S. 265–275. DOI: 10.1074/jbc.M807856200.

Klump, Susanne; Krieglstein, Josef (2002): Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. In: *European Journal of Biochemistry* 269 (4), S. 1067–1071. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.02755.x.

Kneuper, Holger; Janausch, Ingo G.; Vijayan, Vinesh; Zweckstetter, Markus; Bock, Verena; Griesinger, Christian; Uden, Gottfried (2005): The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of *Escherichia coli*. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (21), S. 20596–20603. DOI: 10.1074/jbc.M502015200.

Korepanova, Alla; Gao, Fei P.; Hua, Yuanzi; Qin, Huajun; Nakamoto, Robert K.; Cross, Timothy A. (2005): Cloning and expression of multiple integral membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli*. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 14 (1), S. 148–158. DOI: 10.1110/ps.041022305.

Krämer, J. (2008): Der C4-Dicarboxylat- und Citratsensor DcuS aus *Escherichia coli* – Signalerkennung und Regulation. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.

Krämer, J.; Fischer, J. D.; Zientz, E.; Vijayan, V.; Griesinger, C.; Lupas, A.; Uden, G. (2007): Citrate sensing by the C4-dicarboxylate/citrate sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: binding site and conversion of DcuS to a C4-dicarboxylate- or citrate-specific sensor. In: *Journal of bacteriology* 189 (11), S. 4290–4298. DOI: 10.1128/JB.00168-07.

Krell, Tino; Lacal, Jesus; Busch, Andreas; Silva-Jimenez, Hortencia; Guazzaroni, Maria-Eugenia; Ramos, Juan Luis (2010): Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. In: *Annual review of microbiology* 64, S. 539–559. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134054.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.

Langklotz, Sina; Baumann, Ulrich; Narberhaus, Franz (2012): Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. In: *Biochimica et biophysica acta* 1823 (1), S. 40–48. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.08.015.

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. In: *The Journal of biological chemistry* 247 (19), S. 6323–6331.

Luirink, Joen; Yu, Zhong; Wagner, Samuel; Gier, Jan-Willem de (2012): Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. In: *Biochimica et biophysica acta* 1817 (6), S. 965–976. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2011.12.006.

Mascher, Thorsten; Helmann, John D.; Uden, Gottfried (2006): Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 70 (4), S. 910–938. DOI: 10.1128/MMBR.00020-06.

Massey-Gendel, Elizabeth; Zhao, Anni; Boulting, Gabriella; Kim, Hye-Yeon; Balamotis, Michael A.; Seligman, Len M. et al. (2009): Genetic selection system for improving recombinant membrane protein expression in *E. coli*. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 18 (2), S. 372–383. DOI: 10.1002/pro.39.

6 Literatur

- Meng, Xuan-Yu; Zhang, Hong-Xing; Mezei, Mihaly; Cui, Meng (2011): Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. In: *Current computer-aided drug design* 7 (2), S. 146–157.
- Miller, Jeffrey H. (1992): A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for escherichia coli and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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. In: *Journal of molecular biology* 260 (3), S. 289–298. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0399.
- Mobley, David L.; Dill, Ken A. (2009): Binding of small-molecule ligands to proteins. „what you see“ is not always „what you get“. In: *Structure (London, England : 1993)* 17 (4), S. 489–498. DOI: 10.1016/j.str.2009.02.010.
- Moglich, Andreas; Ayers, Rebecca A.; Moffat, Keith (2009): Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. In: *Structure (London, England : 1993)* 17 (10), S. 1282–1294. DOI: 10.1016/j.str.2009.08.011.
- Monzel, Christian; Unden, Gottfried (2015): Transmembrane signaling in the sensor kinase DcuS of Escherichia coli: A long-range piston-type displacement of transmembrane helix 2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (35), S. 11042–11047. DOI: 10.1073/pnas.1507217112.
- Morris, Garrett M.; Huey, Ruth; Lindstrom, William; Sanner, Michel F.; Belew, Richard K.; Goodsell, David S.; Olson, Arthur J. (2009): AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. In: *Journal of computational chemistry* 30 (16), S. 2785–2791. DOI: 10.1002/jcc.21256.
- Müller-Hill, Benno (1985): Experiments with gene fusions. In: *Trends in Genetics* 1, S. 61. DOI: 10.1016/0168-9525(85)90025-3.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, S. 263–273.
- Mus-Veteau, Isabelle (Hg.) (2014): Membrane Proteins Production for Structural Analysis. New York, NY: Springer New York.
- Mus-Veteau, Isabelle (Hg.) (2014): Membrane Proteins Production for Structural Analysis. New York, NY: Springer New York.
- Narayanan, Anoop; Ridilla, Marc; Yernool, Dinesh A. (2011): Restrained expression, a method to overproduce toxic membrane proteins by exploiting operator-repressor interactions. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 20 (1), S. 51–61. DOI: 10.1002/pro.535.
- Newstead, Simon; Kim, Hyun; Heijne, Gunnar von; Iwata, So; Drew, David (2007): High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in Saccharomyces cerevisiae. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (35), S. 13936–13941. DOI: 10.1073/pnas.0704546104.
- Nyquist, Kristofor; Martin, Andreas (2014): Marching to the beat of the ring: polypeptide translocation by AAA+ proteases. In: *Trends in biochemical sciences* 39 (2), S. 53–60. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.11.003.
- Oxenoid, Kirill; Chou, James J. (2005): The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (31), S. 10870–10875. DOI: 10.1073/pnas.0504920102.
- Pappalardo, Lucia; Jausch, Ingo G.; Vijayan, Vinesh; Zientz, Eva; Junker, Jochen; Peti, Wolfgang et al. (2003): The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of Escherichia coli. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (40), S. 39185–39188. DOI: 10.1074/jbc.C300344200.
- Park, S. J.; Tseng, C. P.; Gunsalus, R. P. (1995): Regulation of succinate dehydrogenase (sdhCDAB) operon expression in Escherichia coli in response to carbon supply and anaerobiosis: role of ArcA and Fnr. In: *Molecular microbiology* 15 (3), S. 473–482.
- Paternostre, M. T.; Roux, M.; Rigaud, J. L. (1988): Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes

during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. In: *Biochemistry* 27 (8), S. 2668–2677.

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. In: *Journal of bacteriology* 180 (16), S. 4160–4165.

Prohl, C.; Wackwitz, B.; Vlad, D.; Uden, G. (1998): Functional citric acid cycle in an arcA mutant of Escherichia coli during growth with nitrate under anoxic conditions. In: *Archives of microbiology* 170 (1), S. 1–7.

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. In: *Journal of bacteriology* 175 (11), S. 3259–3268.

Rath, Arianna; Glibowicka, Mira; Nadeau, Vincent G.; Chen, Gong; Deber, Charles M. (2009): Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (6), S. 1760–1765. DOI: 10.1073/pnas.0813167106.

Rauschmeier, Martina; Schuppel, Valentina; Tetsch, Larissa; Jung, Kirsten (2014): New insights into the interplay between the lysine transporter LysP and the pH sensor CadC in Escherichia coli. In: *Journal of molecular biology* 426 (1), S. 215–229. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.09.017.

Reid, C. J.; Poole, P. S. (1998): Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of Rhizobium leguminosarum. In: *Journal of bacteriology* 180 (10), S. 2660–2669.

Reinelt, Stefan; Hofmann, Eckhard; Gerharz, Tanja; Bott, Michael; Madden, Dean R. (2003): The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (40), S. 39189–39196. DOI: 10.1074/jbc.M305864200.

Rice, P.; Longden, I.; Bleasby, A. (2000): EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. In: *Trends in genetics : TIG* 16 (6), S. 276–277.

Rigaud, J. L.; Paternostre, M. T.; Bluzat, A. (1988): Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. In: *Biochemistry* 27 (8), S. 2677–2688.

Rigaud, J. L.; Pitard, B.; Levy, D. (1995): Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1231 (3), S. 223–246.

Rigaud, Jean-Louis; Levy, Daniel (2003): Reconstitution of membrane proteins into liposomes. In: *Methods in enzymology* 372, S. 65–86. DOI: 10.1016/S0076-6879(03)72004-7.

Sambrook, Joseph; Russell, David William (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schellman, J. A. (1997): Temperature, stability, and the hydrophobic interaction. In: *Biophysical Journal* 73 (6), S. 2960–2964. DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78324-3.

Scheu, P. D.; Liao, Y.-F.; Bauer, J.; Kneuper, H.; Basche, T.; Uden, G.; Erker, W. (2010): Oligomeric Sensor Kinase DcuS in the Membrane of Escherichia coli and in Proteoliposomes. Chemical Cross-linking and FRET Spectroscopy. In: *Journal of bacteriology* 192 (13), S. 3474–3483. DOI: 10.1128/JB.00082-10.

Scheu, Patrick D. (2009): Oligomerisation, Localisation and Interaction of the sensor histidine kinases DcuS and CitA in Escherichia coli. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.

Scheu, Patrick D.; Kim, Ok Bin; Griesinger, Christian; Uden, Gottfried (2010): Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: exogenous versus endogenous sensing of C(4)-dicarboxylates in bacteria. In: *Future microbiology* 5 (9), S. 1383–1402. DOI: 10.2217/fmb.10.103.

Scheu, Patrick D.; Steinmetz, Philipp A.; Dempwolf, Felix; Graumann, Peter L.; Uden, Gottfried (2014): Polar localization of a tripartite complex of the two-component system DcuS/DcuR and the transporter DctA

6 Literatur

in *Escherichia coli* depends on the sensor kinase DcuS. In: *PLoS one* 9 (12), e115534. DOI: 10.1371/journal.pone.0115534.

Schlegel, Susan; Klepsch, Mirjam; Gialama, Dimitra; Wickstrom, David; Slotboom, Dirk Jan; Gier, Jan-Willem de (2010): Revolutionizing membrane protein overexpression in bacteria. In: *Microbial biotechnology* 3 (4), S. 403–411. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2009.00148.x.

Schlegel, Susan; Rujas, Edurne; Ytterberg, Anders Jimmy; Zubarev, Roman A.; Luirink, Joen; Gier, Jan-Willem de (2013): Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels. In: *Microbial cell factories* 12, S. 24. DOI: 10.1186/1475-2859-12-24.

Schwoppe, Christian; Winkler, Herbert H.; Neuhaus, H. Ekkehard (2003): Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in *Escherichia coli*. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 270 (7), S. 1450–1457.

Sevvana, M.; Vijayan, V.; Zweckstetter, M.; Reinelt, S.; Madden, D. R.; Sheldrick, G. M. et al. (2007): Structure of Citrate-bound Periplasmic Domain of Sensor Histidine Kinase CitA.

Sevvana, Madhumati; Vijayan, Vinesh; Zweckstetter, Markus; Reinelt, Stefan; Madden, Dean R.; Herbst-Irmer, Regine et al. (2008): A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. In: *Journal of molecular biology* 377 (2), S. 512–523. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.01.024.

Sievers, Fabian; Wilm, Andreas; Dineen, David; Gibson, Toby J.; Karplus, Kevin; Li, Weizhong et al. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. In: *Molecular systems biology* 7, S. 539. DOI: 10.1038/msb.2011.75.

Six, S.; Andrews, S. C.; Unden, G.; Guest, J. R. (1994): *Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct). In: *Journal of bacteriology* 176 (21), S. 6470–6478.

Skerra, Arne (1994): Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. In: *Gene* 151 (1-2), S. 131–135. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90643-2.

Sliwoski, Gregory; Kothiwale, Sandeepkumar; Meiler, Jens; Lowe, Edward W., JR (2014): Computational methods in drug discovery. In: *Pharmacological reviews* 66 (1), S. 334–395. DOI: 10.1124/pr.112.007336.

Spiro, S.; Guest, J. R. (1990): FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. In: *FEMS microbiology reviews* 6 (4), S. 399–428.

Spiro, S.; Roberts, R. E.; Guest, J. R. (1989): FNR-dependent repression of the *ndh* gene of *Escherichia coli* and metal ion requirement for FNR-regulated gene expression. In: *Molecular microbiology* 3 (5), S. 601–608.

Steinmetz, Philipp Aloysius; Worner, Sebastian; Unden, Gottfried (2014): Differentiation of DctA and DcuS function in the DctA/DcuS sensor complex of *Escherichia coli*: function of DctA as an activity switch and of DcuS as the C4-dicarboxylate sensor. In: *Molecular microbiology* 94 (1), S. 218–229. DOI: 10.1111/mmi.12759.

Stewart, V. (1993): Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. In: *Molecular microbiology* 9 (3), S. 425–434.

Stock, A. M.; Robinson, V. L.; Goudreau, P. N. (2000): Two-component signal transduction. In: *Annual review of biochemistry* 69, S. 183–215. DOI: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183.

Studier, F. W. (1991): Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. In: *Journal of molecular biology* 219 (1), S. 37–44.

Studier, F. W.; Moffatt, B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. In: *Journal of molecular biology* 189 (1), S. 113–130.

Sulimov, Alexey V.; Zheltkov, Dmitry A.; Oferkin, Igor V.; Kutov, Danil C.; Katkova, Ekaterina V.; Tyrtysnikov, Eugene E.; Sulimov, Vladimir B. (2017): Evaluation of the novel algorithm of flexible ligand docking with moveable target-protein atoms. In: *Computational and Structural Biotechnology Journal*. DOI: 10.1016/j.csbj.2017.02.004.

Tate, Christopher G. (2010): Practical considerations of membrane protein instability during purification and

- crystallisation. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 601, S. 187–203. DOI: 10.1007/978-1-60761-344-2_12.
- Taylor, B. L.; Zhulin, I. B. (1999): PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 63 (2), S. 479–506.
- Tetsch, Larissa; Jung, Kirsten (2009): The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. In: *Molecular microbiology* 73 (6), S. 982–991. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06847.x.
- Tetsch, Larissa; Koller, Christiane; Haneburger, Ina; Jung, Kirsten (2008): The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. In: *Molecular microbiology* 67 (3), S. 570–583. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.06070.x.
- Totrov, Maxim; Abagyan, Ruben (2008): Flexible ligand docking to multiple receptor conformations. A practical alternative. In: *Current opinion in structural biology* 18 (2), S. 178–184. DOI: 10.1016/j.sbi.2008.01.004.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354.
- Tran, Q. H.; Unden, G. (1998): Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. In: *European Journal of Biochemistry* 251 (1-2), S. 538–543.
- Trott, Oleg; Olson, Arthur J. (2010): AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. In: *Journal of computational chemistry* 31 (2), S. 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334.
- Unden, G.; Achebach, S.; Holighaus, G.; Tran, H. G.; Wackwitz, B.; Zeuner, Y. (2002): Control of FNR function of *Escherichia coli* by O₂ and reducing conditions. In: *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 4 (3), S. 263–268.
- Unden, G.; Becker, S.; Bongaerts, J.; Holighaus, G.; Schirawski, J.; Six, S. (1995): O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. In: *Archives of microbiology* 164 (2), S. 81–90.
- Unden, G.; Bongaerts, J. (1997): Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. In: *Biochimica et biophysica acta* 1320 (3), S. 217–234.
- Unden, G.; Worner, S.; Monzel, C. (2016): Cooperation of Secondary Transporters and Sensor Kinases in Transmembrane Signalling: The DctA/DcuS and DcuB/DcuS Sensor Complexes of *Escherichia coli*. In: *Advances in microbial physiology* 68, S. 139–167. DOI: 10.1016/bs.ampbs.2016.02.003.
- Unden, Gottfried; Kleefeld, Alexandra (2004): C₄-Dicarboxylate Degradation in Aerobic and Anaerobic Growth. In: *EcoSal Plus* 1 (1). DOI: 10.1128/ecosalplus.3.4.5.
- UniProt Consortium (2015): UniProt: a hub for protein information. In: *Nucleic acids research* 43 (Database issue), D204-12. DOI: 10.1093/nar/gku989.
- Vagenende, Vincent; Yap, Miranda G. S.; Trout, Bernhardt L. (2009): Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. In: *Biochemistry* 48 (46), S. 11084–11096. DOI: 10.1021/bi900649t.
- Valdez-Cruz, Norma A.; Caspeta, Luis; Perez, Nestor O.; Ramirez, Octavio T.; Trujillo-Roldan, Mauricio A. (2010): Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. In: *Microbial cell factories* 9, S. 18. DOI: 10.1186/1475-2859-9-18.
- Wagner, Samuel; Baars, Louise; Ytterberg, A. Jimmy; Klussmeier, Anja; Wagner, Claudia S.; Nord, Olof et al. (2007): Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6 (9), S. 1527–1550. DOI: 10.1074/mcp.M600431-MCP200.
- Wagner, Samuel; Bader, Mirjam Lerch; Drew, David; Gier, Jan-Willem de (2006): Rationalizing membrane protein overexpression. In: *Trends in biotechnology* 24 (8), S. 364–371. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.06.008.
- Wagner, Samuel; Klepsch, Mirjam M.; Schlegel, Susan; Appel, Ansgar; Draheim, Roger; Tarry, Michael et al. (2008): Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. In: *Proceedings of the National Academy of*

6 Literatur

- Sciences of the United States of America* 105 (38), S. 14371–14376. DOI: 10.1073/pnas.0804090105.
- Wallace, B. J.; Young, I. G. (1977): Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a *ubiA- menA-* double quinone mutant. In: *Biochimica et biophysica acta* 461 (1), S. 84–100.
- Watson, R. J. (1990): Analysis of the C4-dicarboxylate transport genes of *Rhizobium meliloti*: nucleotide sequence and deduced products of *dctA*, *dctB*, and *dctD*. In: *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 3 (3), S. 174–181.
- Wei, Y. F.; Matthews, H. R. (1991): Identification of phosphohistidine in proteins and purification of protein-histidine kinases. In: *Methods in enzymology* 200, S. 388–414.
- Wendler, Katharina; Thar, Jens; Zahn, Stefan; Kirchner, Barbara (2010): Estimating the hydrogen bond energy. In: *The journal of physical chemistry. A* 114 (35), S. 9529–9536. DOI: 10.1021/jp103470e.
- Wickner, William; Schekman, Randy (2005): Protein translocation across biological membranes. In: *Science (New York, N.Y.)* 310 (5753), S. 1452–1456. DOI: 10.1126/science.1113752.
- Wingfield, Paul T. (2015): Overview of the purification of recombinant proteins. In: *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]* 80, 6.1.1-35. DOI: 10.1002/0471140864.ps0601s80.
- Witan, Julian; Bauer, Julia; Wittig, Ilka; Steinmetz, Philipp Aloysius; Erker, Wolfgang; Uden, Gottfried (2012): Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. In: *Molecular microbiology* 85 (5), S. 846–861. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08143.x.
- Witan, Julian; Monzel, Christian; Scheu, Patrick D.; Uden, Gottfried (2012): The sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: two stimulus input sites and a merged signal pathway in the DctA/DcuS sensor unit. In: *Biological chemistry* 393 (11), S. 1291–1297. DOI: 10.1515/hsz-2012-0229.
- Worner, Sebastian; Strecker, Alexander; Monzel, Christian; Zeltner, Matthias; Witan, Julian; Ebert-Jung, Andrea; Uden, Gottfried (2016): Conversion of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli* of the DcuB/DcuS sensor complex to the C4-dicarboxylate responsive form by the transporter DcuB. In: *Environmental microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.13418.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. In: *Gene* 33 (1), S. 103–119.
- Yarosh, O. K.; Charles, T. C.; Finan, T. M. (1989): Analysis of C4-dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*. In: *Molecular microbiology* 3 (6), S. 813–823.
- Yernool, Dinesh; Boudker, Olga; Folta-Stogniew, Ewa; Gouaux, Eric (2003): Trimeric subunit stoichiometry of the glutamate transporters from *Bacillus caldoteanax* and *Bacillus stearothermophilus*. In: *Biochemistry* 42 (44), S. 12981–12988. DOI: 10.1021/bi030161q.
- Yurgel, Svetlana N.; Kahn, Michael L. (2004): Dicarboxylate transport by rhizobia. In: *FEMS microbiology reviews* 28 (4), S. 489–501. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.04.002.
- Zacharias, David A.; Violin, Jonathan D.; Newton, Alexandra C.; Tsien, Roger Y. (2002): Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5569), S. 913–916. DOI: 10.1126/science.1068539.
- Zeltner, Matthias (2012): Der Succinat-Transporter DctA aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Zhang, Zhe; Kuipers, Grietje; Niemiec, Lukasz; Baumgarten, Thomas; Slotboom, Dirk Jan; Gier, Jan-Willem de; Hjelm, Anna (2015): High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. In: *Microbial cell factories* 14, S. 142. DOI: 10.1186/s12934-015-0328-z.
- Zhou, Jindan; Rudd, Kenneth E. (2013): EcoGene 3.0. In: *Nucleic acids research* 41 (Database issue), D613-24. DOI: 10.1093/nar/gks1235.
- Zientz, E.; Bongaerts, J.; Uden, G. (1998): Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR* genes) two-component regulatory system. In: *Journal of bacteriology* 180 (20), S. 5421–5425.

Zientz, E.; Janausch, I. G.; Six, S.; Uden, G. (1999): Functioning of DcuC as the C4-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 181 (12), S. 3716–3720.

Zientz, E.; Six, S.; Uden, G. (1996): Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C4-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange. In: *Journal of bacteriology* 178 (24), S. 7241–7247.

Zoonens, Manuela; Zito, Francesca; Martinez, Karen L.; Popot, Jean-Luc (2014): Amphipols: A General Introduction and Some Protocols. In: Isabelle Mus-Veteau (Hg.): *Membrane Proteins Production for Structural Analysis*. New York, NY: Springer New York, S. 173–203.

A Anhang

A Anhang

A.1 Verwendete Chemikalien

Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
[γ - ³³ P]ATP SRF-301	Hartmann Analytics, Braunschweig
Bacto® Trypton	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Decyl Maltose Neopentyl Glycol (DMNG)	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Empigen BB (35 %)	Fluka, Buchs, SG, Schweiz
<i>Escherichia coli</i> Polar Lipid Extract	Avanti, Alabaster, AL, USA
Fos-Choline-12 (99,5 %)	Cube Biotech, Mohnheim am Rhein
Hefeextrakt (Serva®)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Lauryldimethylamine-oxide (LDAO, 30 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lysostaphin 0,5 U/ml	Genmedics GmbH, Reutlingen
n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM, 99,5 %)	Gerbu, Heidelberg
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
n-Nonyl- β -D-maltosid (99 %)	Applichem, Darmstadt
n-Octyl- β -D-Glucopyranosid	Gerbu, Heidelberg
n-Undecyl- β -D-maltosid (99 %)	Applichem, Darmstadt
Octyl Glucose Neopentyl Glycol (OGNG, 99 %)	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Säurehydrolysiertes Casein (AHC)	Fluka, Buchs, SG, Schweiz
Skim Milk Powder	Fluka, Buchs, SG, Schweiz
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

A.2 Ergebnisse Molekulares Docking

Tabelle 10: Mit *Autodock Vina* berechnete relative Affinität und *root mean square deviation* (rmsd) für unterschiedliche Positionierungen der Substrate in DcuS-PAS_p. Mode: Anordnung nach wahrscheinlichster positionierung. Affinity: Relative Affinität. RMSD: root mean square deviation. Lage der Atome des Liganden relativ zum wahrscheinlichsten Bindungsmodus. rmsd l.b. vergleicht die Lage der Atome mit sich selbst, rmsd u.b. vergleicht die Lage von Atome des selben Typs.

L-Malat							
mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode					
		rmsd l.b.	rmsd u.b.				
1	-6.4	0.000	0.000	4	-5.5	1.441	3.163
2	-6.4	0.082	1.044	5	-4.8	1.823	2.326
3	-6.0	0.885	3.473	6	-4.3	1.688	2.891
4	-5.1	1.377	3.323	7	-3.4	1.601	2.023
5	-5.1	0.738	1.664	L-Tartrat			
6	-4.8	1.529	2.639	mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
7	-4.7	1.583	2.931			rmsd l.b.	rmsd u.b.
8	-4.2	1.470	2.178	1	-6.0	0.000	0.000
9	-4.2	1.438	3.161	2	-6.0	0.026	3.083
D-Tartrat				3	-5.5	1.184	1.824
mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode		4	-5.5	1.194	2.997
		rmsd l.b.	rmsd u.b.	5	-5.4	1.170	2.130
1	-5.4	0.000	0.000	6	-5.4	1.118	2.248
2	-5.4	1.180	3.025	7	-5.3	1.151	3.328
3	-5.3	1.034	3.503	8	-5.3	1.191	3.025
4	-5.3	1.070	3.103	9	-5.1	0.994	2.372
5	-5.2	1.180	3.064	Fumarat			
6	-5.1	1.141	2.271	mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
7	-5.0	1.242	2.374			rmsd l.b.	rmsd u.b.
8	-4.9	1.252	1.914	1	-3.5	0.000	0.000
9	-4.9	1.040	2.097	2	-3.5	0.051	4.103
L-Aspartat				3	-3.3	0.099	1.114
mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode		4	-3.3	0.076	4.249
		rmsd l.b.	rmsd u.b.	5	-2.9	9.637	10.539
1	-5.7	0.000	0.000	6	-2.8	9.317	9.859
2	-5.5	0.109	1.047	7	-2.7	9.926	10.863
3	-5.4	1.235	3.476	8	-2.6	9.541	11.016
4	-5.2	1.558	3.193	9	-2.5	9.240	10.096
5	-4.7	1.499	1.980	Mesaconat			
6	-4.3	2.010	2.968	mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
7	-4.2	1.694	2.785			rmsd l.b.	rmsd u.b.
8	-4.0	1.718	3.348	1	-3.8	0.000	0.000
9	-3.9	1.319	1.782	2	-3.8	0.957	1.800
D-Malat				3	-3.5	0.923	3.907
mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode		4	-3.3	9.291	10.634
		rmsd l.b.	rmsd u.b.	5	-3.0	1.539	3.696
1	-5.7	0.000	0.000	6	-2.8	9.780	11.020
2	-5.3	1.288	1.898	7	-2.7	8.879	10.110
3	-5.2	1.268	3.235	8	-2.7	1.549	1.726
4	-5.2	1.222	3.497	9	-2.3	9.230	10.536
5	-5.2	1.392	3.150	Citrat			
6	-5.2	1.283	3.248	mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode	
7	-4.9	1.279	3.370			rmsd l.b.	rmsd u.b.
8	-4.8	1.480	2.588	1	-3.2	0.000	0.000
9	-4.8	1.209	1.827	2	-3.0	1.152	4.023
Succinat				3	-2.9	1.184	2.889
mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode		4	-2.7	1.387	2.058
		rmsd l.b.	rmsd u.b.	5	-2.4	1.554	3.448
1	-6.0	0.000	0.000	6	-2.2	1.438	3.288
2	-6.0	0.027	3.586	7	-2.2	1.526	3.389
3	-6.0	0.183	1.120	8	-1.5	1.430	3.512
				9	-1.4	1.490	3.888

A.3 Vergleich von DcuS-PAS_p und CitA-PAS_p mit gebundenem Substrat

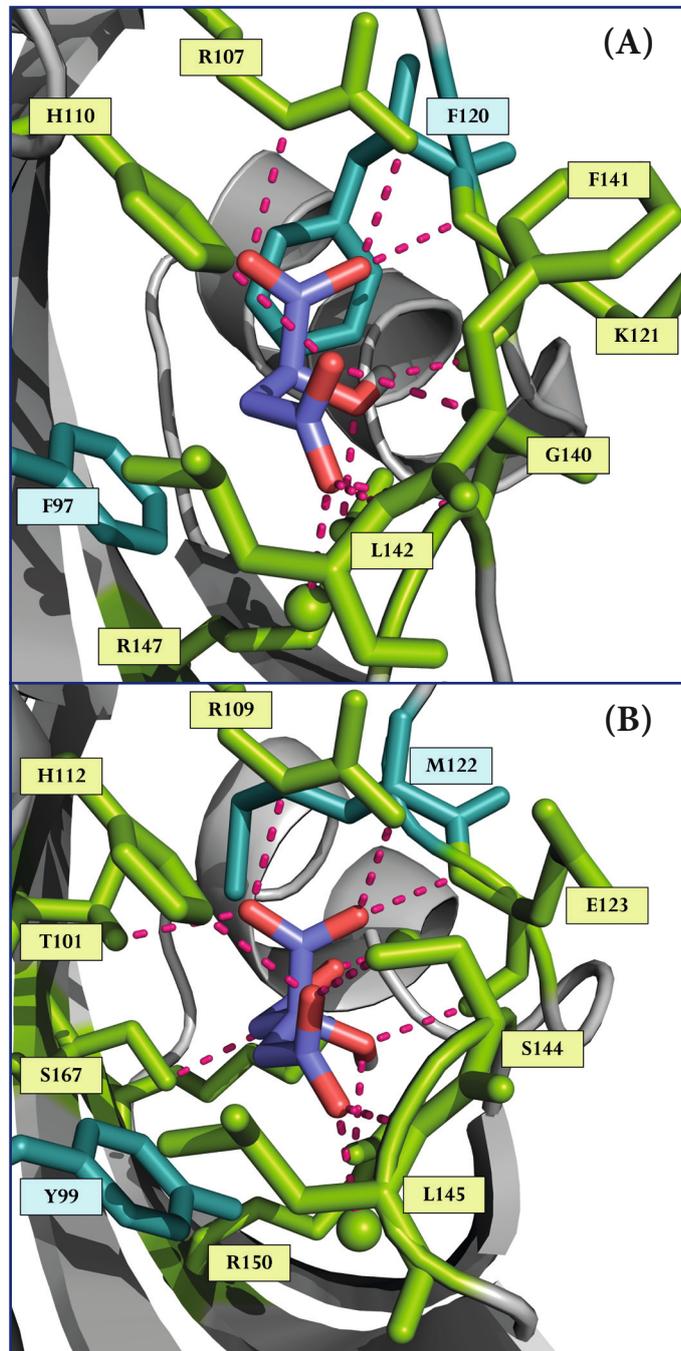


Abb. 29: Positionierung von L-Malat und Citrat in DcuS und Citrat in CitA. A) Struktur von DcuS-PAS_p mit koordiniertem L-Malat (Cheung und Hendrickson 2008). B) Struktur von CitA-PAS_p mit koordiniertem Citrat (Sevvana et al. 2008). Pink = Wasserstoffbrücken. Visualisierung in PyMOL 1.3.

B Abkürzungsverzeichnis

AHC	Acid-hydrolyzed casein
Amp	Ampicillin
APS	Adenosinphosphosulfat
Arc	Aerobic respiration control
ARN _T	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adenosintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BACTH	Bacterial Two-Hybrid
BSA	Bovines Serumalbumin
Cam	Chloramphenicol
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAP	Catabolite Activator Protein
CRP	cAMP Receptor Protein
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DauA	Dicarboxylate uptake system protein A
DctA	Dicarboxylate transport Protein A
DcuB	Dicarboxylate uptake Protein B
DcuR	Dicarboxylate uptake Regulator
DcuS	Dicarboxylate uptake Sensor
DDM	Dodecyl-Maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli

B Abkürzungsverzeichnis

ECF	ExtraCytoplasmic Function
eCFP	Enhanced Cyan Fluorescent Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eM9	Enriched M9
Empigen BB	Lauryl Dimethyl Betaine
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
FAD	Flavinadenindinukleotid
FNR	Fumarate Nitrate reductase Regulator
Frd	Fumaratreduktase
GFP	Green Fluorescent Protein
<i>H-Brücke</i>	Wasserstoffbrücke
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His6	Hexahistidin-Tag
HRP	Horseradish Peroxidase
IPTG	Isopropyl--D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KAXI	Kanamycin/Ampicillin/X-Gal/IPTG
kB	Kilo-Basen
LB	Lysogeny broth
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MU	Miller-Units
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl--D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PASc	Cytoplasmatische PAS-Domäne
PAS	Per-Arnt-SIM
PASp	Periplasmatische PAS-Domäne
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDC	PhoQ, DcuS, CitA
PEG	Polyethylenglycol
RMSD	Root Mean Square Deviation
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SK	Sensor-Histidinkinase
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth with Catabolic repressor
Spc	pectinomycin
SRP	Signaal Recognition Particle
Str	Streptomycin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TEV	Tobacco Etch Virus
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
TM	Schmelztemperatur
TM	T _r ansmembranhelix
TM	Transsmembranhelix
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Transformation and Storage Buffer
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
t	Zeit

B Abkürzungsverzeichnis

UpM	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl--D-galactopyranosid
ZKS	Zwei-Komponenten-System
ü.N.	über Nacht

C Veröffentlichungen und Präsentationen

Veröffentlichungen

Worner, Sebastian; Strecker, Alexander; Monzel, Christian; Zeltner, Matthias; Witan, Julian; Ebert-Jung, Andrea; Uden, Gottfried (2016): Conversion of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli* of the DcuB/DcuS sensor complex to the C4 -dicarboxylate responsive form by the transporter DcuB. In: *Environmental microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.13418.

Poster

S. Wörner, P. A. Steinmetz, M. Zeltner, G. Uden (2014). Differentiation of the Roles of DcuS and DcuB in the DcuB/DcuS-Sensor Complex. 4. Gemeinsamer Kongress von DGHM und VAAM, Dresden.

D Lebenslauf

E Danksagung

Erklärung

Erklärung

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

Mainz, April 2017

