

**Rekonstitution des Fumaratsensors  
DcuS in Liposomen  
und Transport von Fumarat und Succinat  
in *Escherichia coli***

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

vorgelegt von

**Ingo Gerland Janusch**

geb. in Wiesbaden

Mainz, Juni 2001

Tag der mündlichen Prüfung: **2001**

Für meine Mutter und meinen Vater in Dankbarkeit für Ihre Geduld und Unterstützung während meines Studiums.

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>8</b>
Verwendete Stämme von <i>Escherichia coli</i>	8
Medien und Zucht	10
Molekulargenetische Methoden	13
Biochemische Methoden	23
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>32</b>
<b>I. Neue C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier in <i>E. coli</i></b>	<b>32</b>
<u>Identifizierung und Charakterisierung von DcuD</u>	32
Wachstumsverhalten von <i>dcuD</i> Mutanten	33
Expressionsstudien von <i>dcuD</i> aus <i>Escherichia coli</i> K-12	35
Expressionsstudien von <i>dcuD</i> aus Naturisolaten von <i>Escherichia coli</i>	36
Überproduktion von DcuD	38
Succinatbildung in der Glucosefermentation in <i>dcuC</i> und <i>dcuD</i> Mutanten	38
Kinetik des Succinatexports in Suspensionen fermentierender Zellen	41
<u>DctA unabhängiger Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten im aeroben Wachstum</u>	42
Wachstumsverhalten von <i>dctA</i> Mutanten	42
Succinat- und Fumarataufnahme in Zellsuspensionen der <i>dctA</i> Mutante	43
pH-Abhängigkeit der Succinataufnahme	45
Einfluß von Entkoppler auf den Succinattransport	47
Einfluß der C-Quelle auf die Transportaktivitäten	47
Untersuchungen zur Substratspezifität	48
Diffusion von C <sub>4</sub> -Dicarboxylaten durch Phospholipidmembranen	49
<b>II. Charakterisierung des Fumaratsensors DcuS</b>	<b>53</b>
<u>Strukturuntersuchung der periplasmatischen Domäne von DcuS durch NMR-Spektroskopie</u>	54
Struktur der periplasmatischen Domäne	54
Identifizierung der Fumaratbindestelle	57
<u>Rekonstitution und Phosphorylierungsaktivität von DcuSR</u>	60
Überproduktion und Reinigung von DcuS und DcuR	60
Entwicklung eines in vitro Testsystems zur Charakterisierung von DcuSR	63
Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DcuS und DcuR	63
Substratspezifität der Sensorkinase DcuS	67
<b>5. Diskussion</b>	<b>69</b>
<b>6. Veröffentlichungen</b>	<b>80</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>81</b>

## 1. Zusammenfassung

Das Zweikomponentenregulationssystem DcuSR kontrolliert die Expression der wichtigsten fumaratinduzierten Gene in *Escherichia coli*. Die Gene *dcuB* und *dctA*, die für Dicarboxylatcarrier kodieren, sowie das Fumaratreduktase-Operon (*frd*), sind Zielgene für DcuSR. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit wird DcuSR zur CitAB Familie der Zweikomponentensysteme gezählt, deren Mitglieder citrat- oder dicarboxylatinduzierte Genregulation vermitteln.

DcuS ist eine membranständige Sensorkinase mit einer großen periplasmatischen Domäne. NMR-spektroskopische Untersuchungen dieser Domäne zeigten  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter. Damit unterscheidet sich DcuS deutlich von der Bindedomäne des Aspartatsensors (Tar), die nur aus  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist. DcuS erkennt spezifisch Fumarat und andere C<sub>4</sub>-Dicarboxylate. Für die Fumaratbindung wichtige Aminosäuren wurden durch Mutagenese identifiziert.

DcuS wurde gereinigt und in Liposomen rekonstituiert. In Anwesenheit von ATP wird DcuS autophosphoryliert, und der Phosphatrest kann auf gereinigtes DcuR übertragen werden. Damit steht ein funktionelles in vitro Testsystem zur Verfügung. Die Phosphorylierungsaktivität von DcuS wird durch Zugabe von Fumarat oder Succinat gesteigert, nicht aber durch andere Carbonsäuren.

Der Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten erfolgt unter anaeroben Bedingungen durch die sekundären Carrier DcuA, DcuB und DcuC. Es konnte ein weiteres Protein (DcuD) identifiziert werden, das hohe Sequenzähnlichkeit zu DcuC aufweist. Eine Mutante von *dcuD* zeigte keinen Phänotyp. Unter allen getesteten Bedingungen erfolgte auch keine Expression von *dcuD* und überproduziertes DcuD konnte den Ausfall der anderen Dcu Carrier nicht kompensieren. Das deutet darauf hin, daß DcuD ein kryptisches Mitglied der Dcu Carrier ist.

Unter aeroben Bedingungen katalysiert DctA den Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten. Dennoch können *dctA* Mutanten von *E. coli* noch mit Succinat wachsen. Dieser DctA unabhängige Transport erfolgt nicht durch die Dcu Carrier oder CitT. Die Diffusionsrate von Succinat durch Membranen wurde bestimmt. Sie ist um Größenordnungen niedriger als der Transport in der *dctA* Mutante. Bei dem DctA unabhängigen Transportsystem handelt es sich um ein H<sup>+</sup> / Succinat<sup>-</sup> Symporter, der nur bei pH 6 aktiv ist und viele Eigenschaften eines Monocarboxylatcarriers aufweist.

## 2. Einleitung

C<sub>4</sub>-Dicarboxylate sind wichtige Substrate im Stoffwechsel von *Escherichia coli*. Als fakultativ anaerobes Enterobakterium kann *E. coli* diese Substrate unter aeroben und anaeroben Bedingungen für den Energie- oder Baustoffwechsel nutzen.

Im aeroben Stoffwechsel werden C<sub>4</sub>-Dicarboxylate wie Fumarat, Succinat oder Malat und andere Carbonsäuren zu CO<sub>2</sub> oxidiert. Nach Aufnahme der Substrate in die Zelle erfolgt die Umsetzung im Citratcyclus.

Unter anaeroben Bedingungen betreibt *E. coli* mit C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten Fumarat-atmung. Dabei wird Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor genutzt und durch die Fumaratreduktase zu Succinat reduziert. Das katalytische Zentrum der Fumaratreduktase liegt im Cytoplasma, so daß Fumarat zunächst in die Zelle aufgenommen werden muß. Succinat kann anaerob nicht weiter umgesetzt werden und wird als Endprodukt aus der Zelle ausgeschieden (Kröger *et al.*, 2001). Succinat fällt auch bei anderen Stoffwechselprozessen als Endprodukt an. Es entsteht beim anaeroben Wachstum mit Glycerin und Citrat (Lütgens *et al.*, 1980) und bei der Fermentation von Glucose (Gokarn *et al.*, 2000). Bei der gemischten Säuregärung erfolgt beispielsweise nach Umsetzung der Glucose zu Phosphoenolpyruvat eine Carboxylierung zu Oxalacetat mit anschließender Reduktion zu Malat. Dieses wird durch die Fumarase zu Fumarat umgewandelt und dann durch die Fumaratreduktase zu Succinat reduziert.

### Transportsysteme für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate in *E. coli*

Sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen sind spezifische Transportproteine nötig um Dicarboxylate in die Zelle aufzunehmen und Succinat auszuscheiden. Ausserdem ist ein Regulationssystem erforderlich, welches die Synthese der jeweils benötigten Enzyme und Transportsysteme aktiviert.

Der Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten erfolgt über sekundäre Carrier (Abb. 1). Unter aeroben Bedingungen erfolgt nur eine Aufnahme der Substrate in die Zelle. Für die Aufnahme der C<sub>4</sub>-Dicarboxylate im aeroben Stoffwechsel wird der DctA-Carrier verwendet, der die Aufnahme von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten im Symport mit Protonen katalysiert (Davies *et al.*, 1999, Kay *et al.*, 1971, Gutowski *et al.*, 1975). Ein weiterer

Carrier, DcuA, wird konstitutiv gebildet und kann C<sub>4</sub>-Dicarboxylate ebenfalls unter aeroben Bedingungen im Symport mit Protonen aufnehmen (Golby *et al.*, 1998). DcuA hat aber vermutlich nur einen geringen Anteil am Transport unter aeroben Bedingungen. Eine Fünffachmutante, der alle bisher bekannten C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier fehlen, zeigte unter aeroben Bedingungen in saurem pH weiterhin deutliches Wachstum mit Succinat. Dies deutete auf ein weiteres Transportsystem hin. Dieser DctA unabhängige Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten sollte näher charakterisiert werden.

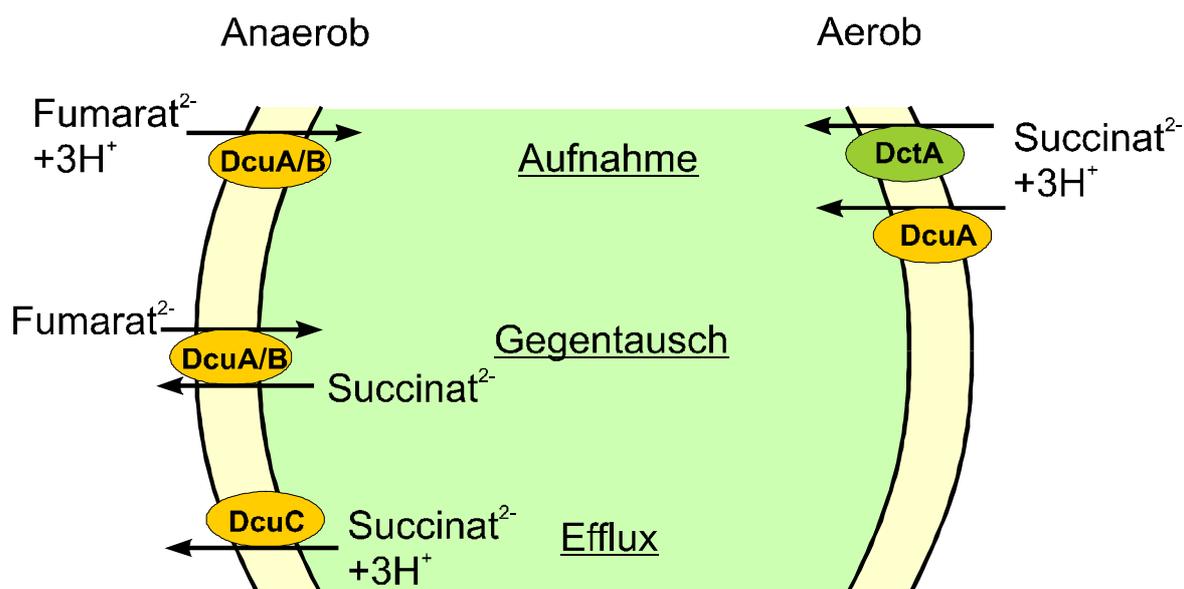


Abb. 1 : Übersicht der bisher bekannten C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier von *E. coli*. Unter aeroben Bedingungen wird die Aufnahme hauptsächlich durch DctA katalysiert. Unter anaeroben Bedingungen erfolgt der Transport durch die Dcu Carrier. Alle Dcu Carrier können Aufnahme, Gegentausch und Efflux katalysieren. In der Abbildung ist jeweils nur der bevorzugte Transportmodus dargestellt.

Unter anaeroben Bedingungen muß sowohl die Aufnahme von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten als auch der Efflux von Succinat katalysiert werden. Die Transportproteine DcuA, DcuB und DcuC können sowohl im Aufnahme- als auch im Gegentauschmodus arbeiten (Engel *et al.*, 1992, Zientz *et al.*, 1996). Die Aufnahme erfolgt im Symport mit Protonen und ist elektrogen. Der Gegentausch dagegen ist elektoneutral und wird durch den Konzentrationsgradienten der Substrate getrieben (Engel *et al.*, 1994).

Im anaeroben Stoffwechsel können sich die Dcu-Carrier größtenteils gegenseitig ersetzen (Zientz *et al.* 1996), sind aber dennoch auf bestimmte Aufgaben spezialisiert. DcuB ist der Carrier mit den höchsten Transportaktivitäten und arbeitet bevorzugt im Gegentausch von Fumarat und Succinat. DcuA katalysiert die Aufnahme von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten (Six *et al.*, 1994). Die Expression von *dcuB* wird durch Anaerobiose

und Fumarat stark stimuliert, während die Expression von *dcuA* permanent auf geringerem Niveau erfolgt.

DcuC hat die geringste Transportaktivität. Die Expression von *dcuC* wird aber im Gegensatz zu *dcuA* und *dcuB* nicht durch Glucose reprimiert. Transportmessungen zeigten für die *dcuC* Mutante höhere Aufnahme- und Gegentauschaktivitäten als für den Wildtyp. Daher scheint DcuC am Efflux von Succinat unter fermentativen Bedingungen beteiligt zu sein (Zientz *et al.*, 1999). Eine Dreifachmutante (*dcuA*, *dcuB*, *dcuC*) ist nicht mehr in der Lage anaerob mit Glycerin und Fumarat zu wachsen. Das Wachstum der Mutante auf Glucose ist jedoch nicht eingeschränkt und die Mutante bildet weiterhin Succinat. Daraus kann man schließen, daß DcuA, DcuB und DcuC die einzigen Carrier für den Fumarat / Succinat Antiport in der Fumaratatmung sind. Für den Efflux des Succinats in der Glucosefermentation müssen jedoch weitere C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier vorhanden sein.

Im *E. coli* Genom gibt es ein homologes Gen (*yhcl*) zu *dcuC*, dessen Genprodukt 35% identische Aminosäuren mit DcuC aufweist. Dieses Gen kodiert möglicherweise ein Transportprotein für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate. Aufgabe dieser Arbeit war die Charakterisierung von Yhcl, mit dem Ziel, eine mögliche Beteiligung am Efflux von Succinat, oder als alternativer C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden *yhcl* Mutanten hergestellt und deren Wachstumsverhalten getestet. Durch Kombination mit *dctA* und *dcu* Mutanten wurde eine Fünffachmutante konstruiert, bei der alle bekannten Dicarboxylatcarrier ausgeschaltet sind. Diese Fünffachmutante wurde zur Untersuchung des Succinateffluxes eingesetzt.

## Regulation durch DcuSR

*Escherichia coli* verfügt über diverse Stoffwechselwege und ist in der Lage viele verschiedene Substrate zur Energiegewinnung zu nutzen. Dabei ist für die Bakterien wichtig immer nur die benötigten Stoffwechselwege zu aktivieren, um nicht unnötig Ressourcen zu verbrauchen. Das Umschalten vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel wird auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit der vorhandenen Elektronenakzeptoren reguliert. Die Elektronenakzeptoren werden einer strengen Hierarchie folgend, von Sauerstoff über Nitrat bis zum Fumarat verwendet. Bei Bakterien erfolgt die Genregulation oft über Zweikomponentensysteme. Eine membranständige Sensorkinase detektiert einen externen Reiz und ein cytoplasmatischer Response-

Regulator reguliert dann die Expression seiner Zielgene. Bei der Signalübertragung spielt die Phosphorylierung die entscheidende Rolle. Das Signal bindet an den Sensor und steuert die Autophosphorylierung an einem konserviertem Histidinrest (Parkinson *et al.*, 1992). Der Phosphatrest wird dann auf einen konservierten Aspartatrest des Regulators übertragen. Dadurch wird eine Konformationsänderung des Response-Regulators induziert, die die Bindung an Zielpromotoren erhöht und die Expression seiner Zielgene positiv oder negativ steuert.

Das Regulationssystem für Fumarat wurde kürzlich entdeckt (Zientz *et al.*, 1998). Dieses Zweikomponentensystem (DcuSR) aktiviert die Gene der Fumaratatmung in Anwesenheit des Substrats Fumarat oder verwandter C<sub>4</sub>-Dicarboxylate (Malat, Succinat, Aspartat), die leicht in Fumarat überführt werden können (Abb. 2).

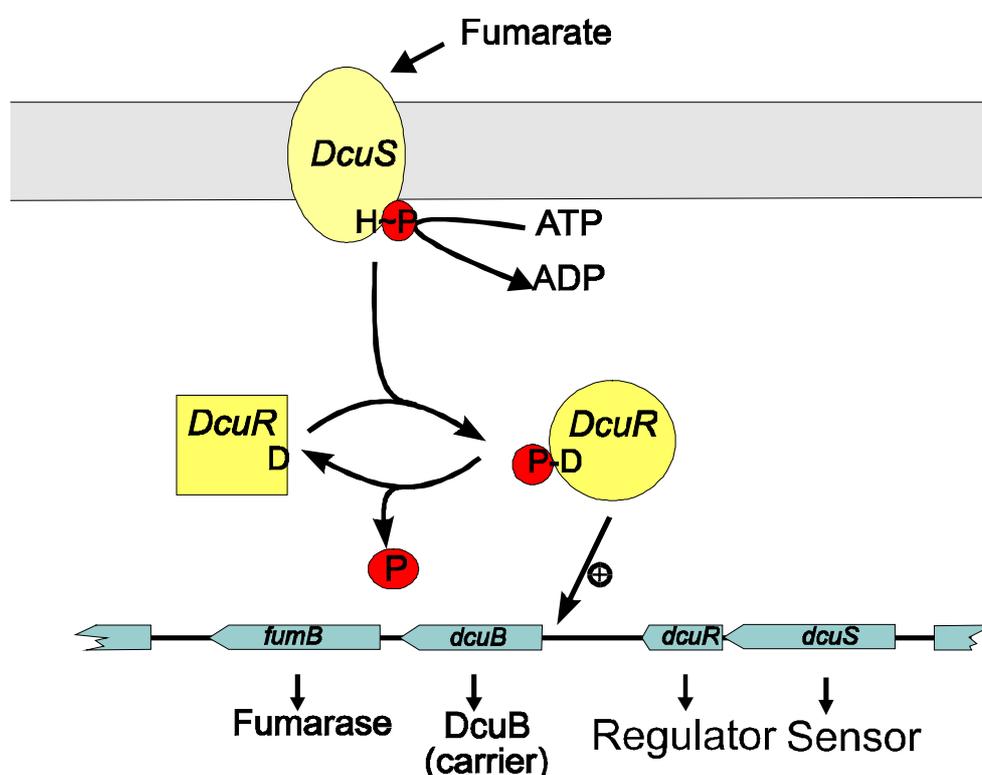


Abb. 2: Funktionsmodell des Zweikomponentensystems DcuSR. Die Sensorkinase erkennt die Anwesenheit von Fumarat im Medium. Es kommt zur Autophosphorylierung von DcuS und zum Transfer des Phosphatrestes auf DcuR. Der Regulator ändert dadurch seine Struktur und kann die Expression seiner Zielgene erhöhen. Die Abbildung zeigt die Position von *dcuSR* auf dem *E. coli* Genom in direkter Nachbarschaft des Zielgens *dcuB*.

Die Gene *dcuS* und *dcuR*, die für das Fumarat Zweikomponenten-Sensor-Regulatorsystem kodieren befinden sich auf dem *E. coli* Genom bei min 93,75 in unmittelbarer Nähe der Gene des anaeroben C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarriers DcuB (*dcuB* Gen) und der Fumarase FumB (*fumB*).

Die fumaratabhängige Expression von *dcuB* wird vollständig durch das DcuSR Zweikomponentensystem reguliert. Die Expression des *fumB* Promotors wird nicht durch Fumarat induziert (Tseng, 1997). *FumB* wird jedoch teilweise mit *dcuB* cotranskribiert und ist damit ebenfalls von DcuSR abhängig. Auch die fumaratabhängige Expression des *frd* Operons ist vollständig von DcuSR abhängig. Das *frd* Operon kodiert für die Fumaratreduktase, das Schlüsselenzym der Fumaratatmung. Unter aeroben Bedingungen reguliert DcuSR die Expression des aeroben C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarriers DctA (Golby *et al.*, 1999). Andere durch Dicarboxylate stimulierte Gene wie die Succinatdehydrogenase (*sdh*), die protonenpumpende NADH Dehydrogenase (*nuo*) oder der Effluxcarrier DcuC werden dagegen nicht durch DcuSR reguliert (Zientz *et al.*, 1998). *E. coli* besitzt 40 - 50 Zweikomponentensysteme (Parkinson *et al.*, 1992), aber trotz ihrer immensen Bedeutung für die Regulation des Stoffwechsels, sind noch viele Details der Funktion unbekannt. Es gibt beispielsweise nur wenige Informationen über die Struktur der periplasmatischen Domänen und der Substratbindestellen (Yeh *et al.*, 1993, 1996, Chi *et al.*, 1997, Milburn *et al.*, 1991).

Die Signalrezeption und der Signaltransfer über die Cytoplasmamembran sind auch noch nicht geklärt. Es wird angenommen, daß die Bindung des Effektors kleine Konformationsänderungen der periplasmatischen Bindedomäne verursacht, die dann über die Transmembranhelices auf die cytoplasmatische Domäne des Sensors übertragen werden. Es werden verschiedene Modelle für den Transfermechanismus und die zugrunde liegenden Konformationsänderungen diskutiert (Yeh *et al.*, 1993). Zur Zeit wird für den Aspartatsensor (Tar) das sogenannte „Piston-Modell“ bevorzugt. Hierbei soll die Ligandenbindung an der periplasmatischen Domäne eine parallele Verschiebung der Transmembranhelices zueinander bewirken (Ottemann *et al.*, 1998, 1999, Lynch *et al.*, 1992). Grundlage für dieses Modell war die Strukturauflklärung der periplasmatischen Domäne vom Aspartatsensor (Bowie *et al.*, 1995, Milburn *et al.*, 1991). Sie besteht aus vier  $\alpha$ -Helices, von denen zwei eine direkte Verlängerung der Transmembranhelices darstellen. So könnte eine Verschiebung der  $\alpha$ -Helices in der Bindedomäne linear auf die Transmembranhelices übertragen werden.

Um die Funktion von DcuS als Sensor genauer zu verstehen, wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Zunächst sollte die Struktur der Sensordomäne untersucht werden, um Hinweise auf Strukturänderungen durch Effektorbindung zu erhalten. Beim DcuSR System wurde bereits begonnen die Struktur der periplas-

matischen Domäne zu untersuchen (Parac *et al.*, 2001). Diese Experimente sollten in der vorliegenden Arbeit vervollständigt werden, mit dem Ziel die Bindestelle der Effektoren zu identifizieren und zu charakterisieren. Insbesondere sollten strukturelle Änderungen durch Fumarat und Strukturverschiebungen, die auf die Transmembranelices übertragbar sind, identifiziert werden.

Zweitens sollte in einem proteinchemischen Ansatz DcuS isoliert und in Liposomen rekonstituiert werden. Mit diesem *in vitro* System sollten dann die biochemischen Parameter der Funktion von DcuS untersucht werden. Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit ein funktionelles, zellfreies Testsystem zu entwickeln.

### 3. Material und Methoden

#### Verwendete Stämme von *Escherichia coli*

Tab. 1: Verwendete Stämme von *E. coli*, Plasmide und Phagen

	Genotyp	Referenz / Quelle
Stämme:		
AN387	Wildtyp	Wallace & Young, 1977
MC4100	<i>F</i> <sup>-</sup> <i>araD139</i> Δ( <i>argF-lac</i> ) <i>U169</i> , <i>rpsL150 relA1 flbB530 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Silhavy <i>et al.</i> , 1984
BL21DE3	<i>E. coli</i> B, <i>F</i> <sup>-</sup> <i>hsdS gal1 ompT dcm</i>	Studier & Moffat, 1986
JC7623	<i>recB21 recC22 sbcB15 leu arg his thr pro ara</i>	Winans <i>et al.</i> , 1985
JM105	<i>thi strA endA sbcB15 hsdR4</i> Δ( <i>lac-proAB</i> ) <i>F</i> <sup>-</sup> <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ</i> Δ <i>M15</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
IMW237	MC4100, λ [Φ( <i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> )] <i>hyb amp</i> <sup>R</sup>	Zientz <i>et al.</i> , 1998
IMW260	MC4100, λ [Φ( <i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> )] <i>hyb amp</i> <sup>R</sup> <i>dcuS::cam</i> <sup>R</sup>	Zientz <i>et al.</i> , 1998
IMW157	AN387 <i>dcuC::Tn10, cam</i> <sup>R</sup>	Zientz <i>et al.</i> , 1996
JRG2814	AN387 <i>dcuB::kan</i> <sup>R</sup> <i>dcuA::spc</i> <sup>R</sup>	Six <i>et al.</i> , 1994
IMW153	AN387, <i>dcuA::spc</i> <sup>R</sup> <i>dcuB::kan</i> <sup>R</sup> <i>dcuC::miniTn10</i>	Zientz <i>et al.</i> , 1996
IMW282	<i>E. coli</i> Wildtyp (Isolat aus einem Klärwerk)	Diese Arbeit
IMW208	AN387, <i>dcuD::spc</i> <sup>R</sup>	Diese Arbeit
IMW283	AN387, <i>dcuA::spc</i> <sup>R</sup> <i>dcuB::kan</i> <sup>R</sup> <i>dcuD::spc</i> <sup>R</sup>	IMW208 x P1 (JRG2814)
IMW209	AN387, <i>dcuA::spc</i> <sup>R</sup> <i>dcuB::kan</i> <sup>R</sup> <i>dcuC::miniTn10, cam</i> <sup>R</sup> <i>dcuD::spc</i> <sup>R</sup>	IMW283 x P1 (IMW157)
IMW243	AN387, aber <i>dcuD::amp</i> <sup>R</sup>	Diese Arbeit
IMW244	AN387, <i>dctA::spc</i> <sup>R</sup> <i>dcuA::spc</i> <sup>R</sup> <i>dcuB::kan</i> <sup>R</sup> <i>dcuC::miniTn10, cam</i> <sup>R</sup> <i>dcuD::amp</i> <sup>R</sup>	IMW213b x P1 (IMW243)
IMW259	MC4100, λ Φ( <i>dcuD-lacZ</i> ) <i>amp</i> <sup>R</sup>	Diese Arbeit
MDO1100	AN387, but <i>dctA::spc</i> <sup>R</sup> <i>dcuB::kan</i> <sup>R</sup> <i>dcuA::spc</i> <sup>R</sup>	Davies <i>et al.</i> , 1999
IMW213b	AN387, <i>dctA::spc</i> <sup>R</sup> <i>dcuA::spc</i> <sup>R</sup> <i>dcuB::kan</i> <sup>R</sup> <i>dcuC::miniTn10, cam</i> <sup>R</sup>	MDO1100 x P1 (IMW153)
IMW264	AN387, <i>citT::kan</i> <sup>R</sup>	Diese Arbeit
IMW277	AN387, <i>dcuA::spc</i> <sup>R</sup> <i>dcuB::kan</i> <sup>R</sup> <i>dcuC::miniTn10, cam</i> <sup>R</sup> <i>citT::kan</i> <sup>R</sup>	IMW153 x P1 (IMW164)
IMW281	AN387, <i>dctA::spc</i> <sup>R</sup> <i>dcuA::spc</i> <sup>R</sup> <i>dcuB::kan</i> <sup>R</sup> <i>dcuC::miniTn10, cam</i> <sup>R</sup> <i>citT::kan</i> <sup>R</sup>	MDO1100 x P1 (IMW277)

Plasmide:

pUC18	Klonierungsvektor, amp <sup>R</sup>	Yanisch-Perron, 1985
pKSII <sup>-</sup>	Klonierungsvektor, amp <sup>R</sup>	Alting-Mees, 1989
pET28a	Expressionsplasmid, kan <sup>R</sup>	Novagen, Madison, USA
pJL28	Derivat des Fusionsplasmids pMLB1034 (Silhavy, 1984), 'lacZ, amp <sup>R</sup>	Lucht, 1992
pJL30	wie Fusionsplasmid pJL28, aber anderer Leserahmen, 'lacZ, amp <sup>R</sup>	Lucht, 1992
pASK-IBA1ca	Expressionsplasmid, amp <sup>R</sup>	IBA, Göttingen
pGS606	pUC118 mit spc <sup>R</sup> Kasette in BamHI, amp <sup>R</sup>	Six <i>et al.</i> , 1994
pUC-Kan	pUC118 mit kan <sup>R</sup> Kasette in PstI, amp <sup>R</sup>	Six <i>et al.</i> , 1994
pMW167	pUC18 mit 2,2 kb XbaI / HindIII Fragment <i>dcuS</i>	Zientz, 2000
pMW145	peripl. Domäne von <i>dcuS</i> in pET28a, kan <sup>R</sup>	Zientz, 2000
pMW82	pKSII <sup>-</sup> mit HindIII / EcoRI Fragment 'yhck- <i>dcuD</i> ' und PstI / XbaI Fragment ' <i>dcuD-sspA</i> ' amp <sup>R</sup>	Janausch, 1997
pMW83	pMW82 mit EcoRI / PstI 2.1 kb spc <sup>R</sup> ( <i>dcuD::spc<sup>R</sup></i> )	Diese Arbeit
pMW97	pMW82 mit EcoRI / PstI 1.5 kb amp <sup>R</sup> ( <i>dcuD::amp<sup>R</sup></i> ) und Scal / XbaI tet <sup>R</sup> in die ursprüngliche <i>bla</i> site ( <i>bla::tet<sup>R</sup></i> )	Diese Arbeit
pMW86	pJL30 mit EcoRI / SalI Fragment ' <i>yhck-dcuD</i> ' aus AN387 amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW86a	pJL30 mit EcoRI / SalI Fragment ' <i>yhck-dcuD</i> ' aus IMW282 amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW129b	pKSII <sup>-</sup> mit <i>citT::kan<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
pMW146	pASK-IBA1ca mit P <sub>tet</sub> <i>dcuD-streptag</i> und <i>tetR</i> amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW151	pET28a mit 2,2 kb XbaI / HindIII Fragment von <i>dcuS</i> (zur Überexpression), kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW180	pET28a mit 0,7 kb NdeI / HindIII Fragment von <i>dcuR</i> (zur Überexpression), kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW181	pET28a mit 2,2 kb XbaI / HindIII Fragment <i>dcuS</i> (mit eigenem Promotor), kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW182	pMW181, aber R139I, kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW183	pMW181, aber R147I, kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW184	pMW181, aber R139I und R147I, kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW185	pMW151, aber R139I, kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW186	pMW151, aber R147I, kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW187	pMW151, aber R139I und R147I, kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW188	pMW145, aber R139I, kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW189	pMW145, aber R147I, kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW190	pMW145, aber R139I und R147I, kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

Phagen:

P1kc		Miller, 1992
λRZ5	λ' <i>bla</i> , 'lacZ, lacY <sup>+</sup>	Ostrow <i>et al.</i> , 1986

## Medien und Zucht

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

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

### LB-Agarplatten:

LB-Medium mit 15 g / l Agar

### M9-Medium (Miller, 1992):

Stammlösung (10 x konzentriert):

60 g / l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
 30 g / l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 5 g / l NaCl  
 10 g / l  $\text{NH}_4\text{Cl}$

Zusätze:

10 mM  $\text{CaCl}_2$  (10 ml / l)  
 10 % AHC (10 ml / l)  
 1 % Trp (5 ml / l)  
 1 M  $\text{MgSO}_4$  (1 ml / l)

Die Stammlösung wurde getrennt von den Zusätzen autoklaviert und mit deionisiertem Wasser zur Endkonzentration aufgefüllt. Der pH Wert betrug in der Regel 7,0. Je nach Bedarf wurde der Phosphatpuffer so variiert, daß der pH Wert bei 6,0 oder 8,0 lag.

### MOPS-Medium (Neidhardt *et al.*, 1974):

Stammlösung (10 x konzentriert):

10 ml / l  $\text{FeSO}_4$ , 0,01 M  
 50 ml / l  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,9 M  
 10 ml / l  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0,276 M  
 10 ml / l  $\text{CaCl}_2$ ,  $5 \times 10^{-4}$  M  
 10 ml / l  $\text{MgSO}_4$ , 0,528 M  
 100 ml / l NaCl, 5 M  
 400 ml / l MOPS, 1 M  
 40 ml / l Tricine, 1 M  
 10 ml / l Metallsalzlösung

Metallsalzlösung:

$3 \times 10^{-6}$  M  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   
 $4 \times 10^{-4}$  M  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
 $3 \times 10^{-5}$  M  $\text{CoCl}_2$   
 $8 \times 10^{-5}$  M  $\text{MnCl}_2$   
 $1 \times 10^{-5}$  M  $\text{ZnSO}_4$

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und dann die Stammlösung angesetzt. Ein Liter MOPS-Medium enthält 100 ml Stammlösung und 10 ml  $K_2HPO_4$  (0,123 M). Es wurde mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

Antibiotikazusätze:

50  $\mu$ g / ml Ampicillin  
 20  $\mu$ g / ml Chloramphenicol  
 50  $\mu$ g / ml Kanamycin  
 50  $\mu$ g / ml Spectinomycin  
 15  $\mu$ g / ml Tetracyclin

Bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer Antibiotika wurden die Konzentrationen halbiert.

P1<sub>kc</sub>-Phagen Vermehrung:

R-Agar:

10 g / l Bacto-Trypton (Difco)  
 1 g / l Hefeextrakt (Gibco)  
 8 g / l NaCl  
 1 g / l Glucose  
 12 g / l Agar (Difco)

R-Top-Agar:

wie R-Agar aber nur 6,5 g / l Agar (Difco)

Nach dem autoklavieren hinzufügen:

10 ml / l  $MgSO_4$ , 1 M  
 10 ml / l  $CaCl_2$ , 0,5 M

$\lambda$ -Phagen Vermehrung:

TB-Medium:

10 g / l Pepton (Gibco, Nr. 140)  
 5 g / l NaCl

TB-Agar:

TB-Medium mit 10 g / l Agar

TB-Top-Agar:

TB-Medium mit 6,5 g / l Agar

YM-Medium:

TB-Medium mit 20 ml / l Maltose (10 %) und 10 ml / l Hefeextrakt (1 %)

SM-Puffer:

100 mM NaCl

20 mM Tris / HCl (pH 7,5)

10 mM MgSO<sub>4</sub>

### Zucht von *Escherichia coli*

Für Vorkulturen und Kulturen für genetische Arbeiten wurden die Bakterien in LB-Medium gezüchtet und nach Bedarf wurden Antibiotika zugesetzt. Bei Zugabe von mehreren Antibiotika wurden die Konzentrationen halbiert. Für die Wachstumskurven erfolgte die Zucht in M9-Medium mit jeweils 50 mM Substrat. Es wurde mit 1 Vol. % Vorkultur angeimpft. Bei aerobem Ansatz wurden 30 ml Kultur in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 180 Upm geschüttelt (Innova 4000, New Brunswick Scientific). Für die anaeroben Zuchten wurden 100 ml Kultur in gasdichten Druckflaschen 3 x 15 min evakuiert und anschließend mit 1,2 atm Stickstoff begast. Die Inkubation erfolgte immer bei 37°C. Zur Untersuchung der Stoffwechselprodukte durch HPLC wurden die Zuchten entsprechend in MOPS-Medium durchgeführt. Die Isolierung eines *E. coli* Stammes aus dem Klärwerk Mainz-Mombach erfolgte auf Endoagarplatten (BBL Microbiology Systems). Dabei entwickeln Enterobacteriaceae grüne, metallisch glänzende Kolonien.

Zur Überproduktion von unmarkiertem Protein wurden die Zellen in LB-Medium gezüchtet. Zur Überproduktion von markiertem Protein wurde M9-Medium ohne NH<sub>4</sub>Cl verwendet und 1 g / l [<sup>15</sup>N]-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Martek) zugesetzt. Für doppelmarkiertes Protein wurde zusätzlich 7 mM [<sup>13</sup>C]-Glucose als C-Quelle verwendet. Die Kulturen wurden mit 2 % Inokulum angeimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Die Induktion der Überexpression erfolgte in der Regel bei OD<sub>578nm</sub> von 0,5 und die Zellernte nach ca. 3 - 4 Stunden bei OD<sub>578nm</sub> von 1,3. Vor und nach der Induktion wurde 1 ml der Kultur entnommen, im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Bei einer Überproduktion von Protein konnte man eine starke zusätzliche Bande im SDS-Gel erkennen, die bei der Probe vor der Induktion nicht zu sehen war.

## Molekulargenetische Methoden

Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Restriktionsenzyme stammten von den Firmen Boeringer, Fermentas und Pharmacia. Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach der Methode von Chen und Kuo (1993). Die analytische Isolierung von Plasmiden wurde nach der „Boiling-lysis“-Methode von Holmes und Quigley (1981) durchgeführt. Dabei wurden 1,5 ml Übernachtskultur verwendet und in 40 µl TE-Puffer (10 mM Tris / HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA) resuspendiert. Die präparative Isolierung erfolgte entweder mit dem Nucleobond System der Firma Macherey-Nagel, dem Qiaprep-Spin (Mini), Qiaprep (Midi) oder Qiafilter (Maxi) System der Firma Qiagen. Dazu wurden 25 - 250 ml Kultur verwendet. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde Nucleo Extract Kit (Macherey-Nagel) oder der Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder Nucleospin Kit (Macherey-Nagel).

Die Ligation wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Dabei betrug das Verhältnis von Vektor zu Insert 1 : 3 und erfolgte über Nacht bei 16°C.

Die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformation wurden nach der RbCl-Methode (Hanahan, 1983) durchgeführt. In der Regel wurden 8 µl Ligationsansatz und 200 µl kompetente Zellen verwendet. Alternativ kamen bei der Transformation die Elektroporation (Pfeiffer *et al.*, 1993) und veränderte RbCl-Methoden (Chung *et al.*, 1989 und Inoue *et al.*, 1990) zur Anwendung.

### Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die benötigten Oligonucleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, HPSF gereinigt) synthetisiert und sind in Tabelle 2 aufgelistet. Als Template wurde genomische DNA von AN387 oder Plasmid DNA verwendet. Die Zugabe der Polymerase erfolgte erst nach der ersten Denaturierung (hot start). Zur Amplifizierung wurde im Progene Thermocycler (Techne) oder im Genius Thermocycler (Techne) folgender Reaktionsansatz gewählt:

100 ng	genomische DNA oder 2 ng Plasmid DNA
2,5 µl	PCR Puffer (20 x konz., Biozym)
1,0 U	Tfl-Polymerase (Biozym)

20 pmol	Oligonukleotid 1
20 pmol	Oligonukleotid 2
2,5 µl	DMSO (nur bei genomischer DNA)
2,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
1,0 µl	dNTP-Mix (10M)

Es wurde auf 50 µl mit bidestiliertem Wasser aufgefüllt.

Folgende Zyklen wurden durchlaufen:

1.)	3,0 min 95°C	0,5 min Annealing Temp.	0,5 – 2 min 72°C	1 x
2.)	0,5 min 95°C	0,5 min Annealing Temp.	0,5 – 2 min 72°C	30 x
3.)	0,5 min 95°C	0,5 min Annealing Temp.	5 min 72°C	1 x

Die Annealing Temperatur wurde für die jeweiligen Oligonukleotide angepaßt. Dabei lag die Annealing Temperatur in der Regel 2°C unter dem Schmelzpunkt ( $T_m$ ) der Primer. Die Berechnung des Schmelzpunktes erfolgte nach folgender Formel:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times \text{GC-Gehalt (in \%)} - 650 / \text{Anzahl der Primernukleotide}$$

Für je 1000 zu amplifizierende Nukleotide wurden 0,5 Minuten Elongationszeit berücksichtigt. Die Überprüfung der PCR erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung von 5 µl Reaktionsansatzes im Agarosegel. Vor der Weiterverarbeitung erfolgte eine Reinigung mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen), oder dem Nucleospin Kit (Macherey-Nagel).

Tab. 2      Verwendete Oligonukleotide für die PCR

Nr.	Name	Sequenz	Restriktions-schnittstelle
1	YHCLHind/1	AGAAAGGAAAGCTTTCGCCATGCC	<i>HindIII</i>
2	YHCLEco24	AATCCGGGAATTCGGTTGGACAG	<i>EcoRI</i>
3	YHCLPst26	TATTCCGAATACTGCAGCCGGACTAC	<i>PstI</i>
4	YHCLEndeXba24	G TTCAGCTTCTAGAGCAGATGCCG	<i>XbaI</i>
5	M-Pst24	GCCGTATATTATTCTGCAGGCAAC	<i>PstI</i>
6	M-Hind24	CGCAAGTTAAGCTTGC GGAAGAAC	<i>HindIII</i>

7	F-Eco27	GGATGAGAAAGGAATTCTTTTCGCCATG	<i>EcoRI</i>
8	F-Sal32	GATATAATTATGTCGACCATTGTTGAACTCCG	<i>SalI</i>
9	EcoTet21	TAATACCGCGCCACATAGCAG	keine
10	PstTet24	CTCCAATTCCTGCAGTGGTGAATC	<i>PstI</i>
11	AmpEco-24	GCACTTAAGGTTGCAGTTTCCCGC	<i>EcoRI</i>
12	AmpPst-23	TTTGCAAGCTGCAGATTACGCGC	<i>PstI</i>
13	I-Sal29	TTTTGACACGGAGTGTCGACATGTTCCGGC	<i>SalI</i>
14	I-Pst34	GTCTTTTTAATCTGCAGATAAAATAGCGTGATTG	<i>PstI</i>
15	pdcuS-Nde2	ATTTACTTCTCGCATATGAGTGATATG	<i>NdeI</i>
16	pdcuS-Hind	GACCAGATAAAGCTTCAGCGACTG	<i>HindIII</i>
17	Mut-R-AB-45-For	GCTATCAATATCGGTTTTCTGGCGCAGGCTTTA ATCGTATTTACC	keine
18	Mut-R-AB-45-Rev	GGTAAATACGATTAAAGCCTGCGCCAGAAAACC GATATTGATAGC	keine
19	Mut-R-A-28-For	GTCGCTATCAATATCGGTTTTCTGGCG	keine
20	Mut-R-A-28-Rev	GCGCCAGAAAACCGATATTGATAGCGA	keine
21	Mut-R-B-28-For	GGCGCAGGCTTTAATCGTATTTACCCCC	keine
22	Mut-R-B-28-Rev	GGGGGTAAATACGATTAAAGCCTGCGCC	keine
23	CitT-Hind-24	CACCTGGAAGCTTTCTCACCAAAC	<i>HindIII</i>
24	CitT-Xho-24	ATTTCTCGAGTCAGGCGTACCATC	<i>XhoI</i>
25	CitT-Eco-24	CCCGGAGAATTCATACCCTAATGC	<i>EcoRI</i>
26	CitT-Pst-24	AGAAGCGGTA <u>CTGCAGGGATTACG</u>	<i>PstI</i>
27	pdcuR-Nde-22	GAGGTCGAACATATGATCAATG	<i>NdeI</i>
28	pdcuR-Hind-22	TAACCAGCGAAGCTTTATTGGC	<i>HindIII</i>
29	DcuS-C	ATTA <u>AAAGCTTGATCATCTGTTCGAC</u>	<i>HindIII</i>
30	DcuS-N	CACACAAGGAAGCATATGAGACATTC	<i>NdeI</i>

---

### Konstruktion der Insertionsmutanten

Zur Geninaktivierung wurden die flankierenden Bereiche des Zielgens mit PCR amplifiziert und in pKSII<sup>r</sup> kloniert. Zwischen diese Fragmente wurde dann eine Resistenzkassette kloniert. Dieses Plasmid wurde linearisiert und in den Stamm JC7623 transformiert. Dieser Stamm kann kein Plasmid vermehren, so daß die entsprechende Resistenz nur erhalten bleibt, wenn die Plasmid DNA ins Genom

integriert (Oden *et al.*, 1990). Hierbei kommt es bevorzugt zu einer Rekombination zwischen den homologen Bereichen des Zielgens auf dem Chromosom und dem Plasmid. Wenn eine doppelte homologe Rekombination erfolgt, ersetzt die (durch die Resistenzkassette unterbrochene) Kopie des Zielgens das Original auf dem Chromosom. Die entsprechenden Klone zeichnen sich daher durch die erworbene Resistenz aus. Die Deletion im Zielgen kann mittels PCR überprüft werden. Klone mit inserierter Resistenzkassette liefern dabei deutlich größere PCR Produkte.

Nach diesem Schema wurden die Gene *dcuD* und *citT* inaktiviert. Die Primerpaare YHCLHind/1 und YHCLEco24, sowie YHCLPst26 und YHCLEndeXba24 wurden für die Amplifikation der flankierenden Fragmente von *dcuD* benutzt (Abb. 4a), die Primer CitT-Hind-24, CitT-Xho-24, CitT-Eco-24 und CitT-Pst-24 für *citT* (Abb. 3). Als Resistenzkassette wurde Spectinomycin (aus pGS606) für *dcuD* und Kanamycin (aus pUC-Kan) für *citT* verwendet. Die so konstruierten Plasmide wurden dann für die homologe Rekombination verwendet. Nach erfolgreichem Genaustausch wurden die mutierten Gene der entsprechenden Klone mittels PCR überprüft. Außerdem wurde eine *dcuD* Mutante mit Ampicillinresistenz hergestellt, um verschiedene Kombinationen von Mehrfachmutanten mit *dctA* und *dcu* zu ermöglichen.

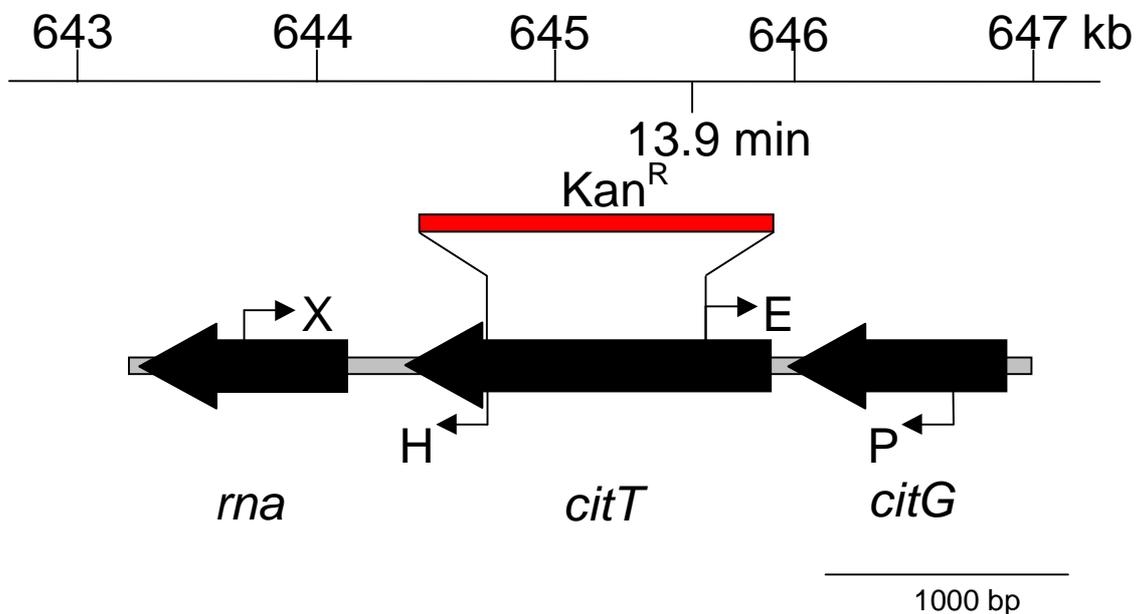


Abb. 3: Chromosomaler Bereich von *citT* und Konstruktion der Insertionsmutante von *citT*. Die inserierte Resistenzkassette ( $\text{Kan}^R$ ) des Plasmids pMW129b ist angegeben. Die Positionen auf dem Chromosom sind in Kilobasen und Minuten angegeben. Primer zur Amplifikation der DNA-Fragmente: X CitT-Xho-24, H CitT-Hind-24, E CitT-Eco-24, P CitT-Pst-24.

### Konstruktion der *lacZ*-Reporterfusion

Die intergenische Region vor *dcuD* wurde mit dem Oligonukleotidpaar F-Eco27 und F-Sal32 amplifiziert. Als Template für die PCR diente die genomische DNA von AN387 (Laborstamm) oder IMW282 (Naturisolat). Durch die Primer wurden die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SalI* eingeführt. Über diese Schnittstellen erfolgte die Klonierung in den Fusionsvektor pJL30 (Lucht, 1992) (Abb. 4b). Die Genfusionen von den so hergestellten Plasmiden pMW86 (mit *dcuD*-Promotor aus AN387) und pMW86a (mit *dcuD*-Promotor aus IMW282) wurden mit Hilfe des Phagen  $\lambda$ RZ5 in das *E. coli* Chromosom von MC4100 transduziert.

### Rekombination der *lacZ*-Fusion mit $\lambda$ RZ5

Ein Stamm mit dem Fusionsplasmid pMW86 (*dcuD*'-'*lacZ*) wurde mit dem Phagen  $\lambda$ RZ5 für 30 min bei 37°C infiziert und mit TB-Top-Agar auf TB-Agarplatten ausplattiert. Ein Einzelplaque wurde mit einer Pasteurpipette aus dem Top-Agar ausgestochen und in 0,5 ml SM-Puffer überführt. Es wurden 25  $\mu$ l Chloroform zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 10000 x g für 2 min zentrifugiert. Mit dem entstandenen Mini-Lysat wurden MC4100 (*lac*<sup>-</sup>) Zellen infiziert und mit 10 mg / ml X-Gal ausplattiert. Auf diesen Platten wurde nach rekombinanten blauen Plaques gesucht. Diese wurden durch wiederholtes Ausplattieren und Isolieren von nicht rekombinanten Phagen getrennt und ein homogenes Plattenlysat hergestellt. Eine Übernachtkultur des Rezipientenstammes in YM-Medium wurde mit dem Lysat versetzt. Nach kurzer Inkubation wurden die Zellen auf LB-Ampicillin-Na<sub>3</sub>-Citrat-X-Gal-Platten ausplattiert. Von mehreren Kolonien wurde die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Aktivitäten der Stämme unterschieden sich nicht voneinander. Es handelt sich dabei um einfachlysogene Stämme. Mehrfachlysogene Stämmen mit höherer  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden nicht gefunden.

### Konstruktion der Expressionsplasmide

Das komplette Gen *dcuD* wurde mit den Primern I-Sal29 und I-Pst34 amplifiziert und mit den eingefügten Restriktionsschnittstellen *SalI* und *PstI* in pASK-IBA1ca (IBA) kloniert. In dem so konstruierten Expressionsplasmid pMW146 stand *dcuD* unter Kontrolle eines induzierbaren *tet*-Promotors und konnte nach Induktion mit Anhydrotetracyclin (200 ng / ml) überproduziert werden. Dabei erfolgte die Expression von *dcuD* als Fusionsprotein mit einem C-terminalem Strep-tag (Abb. 4c).

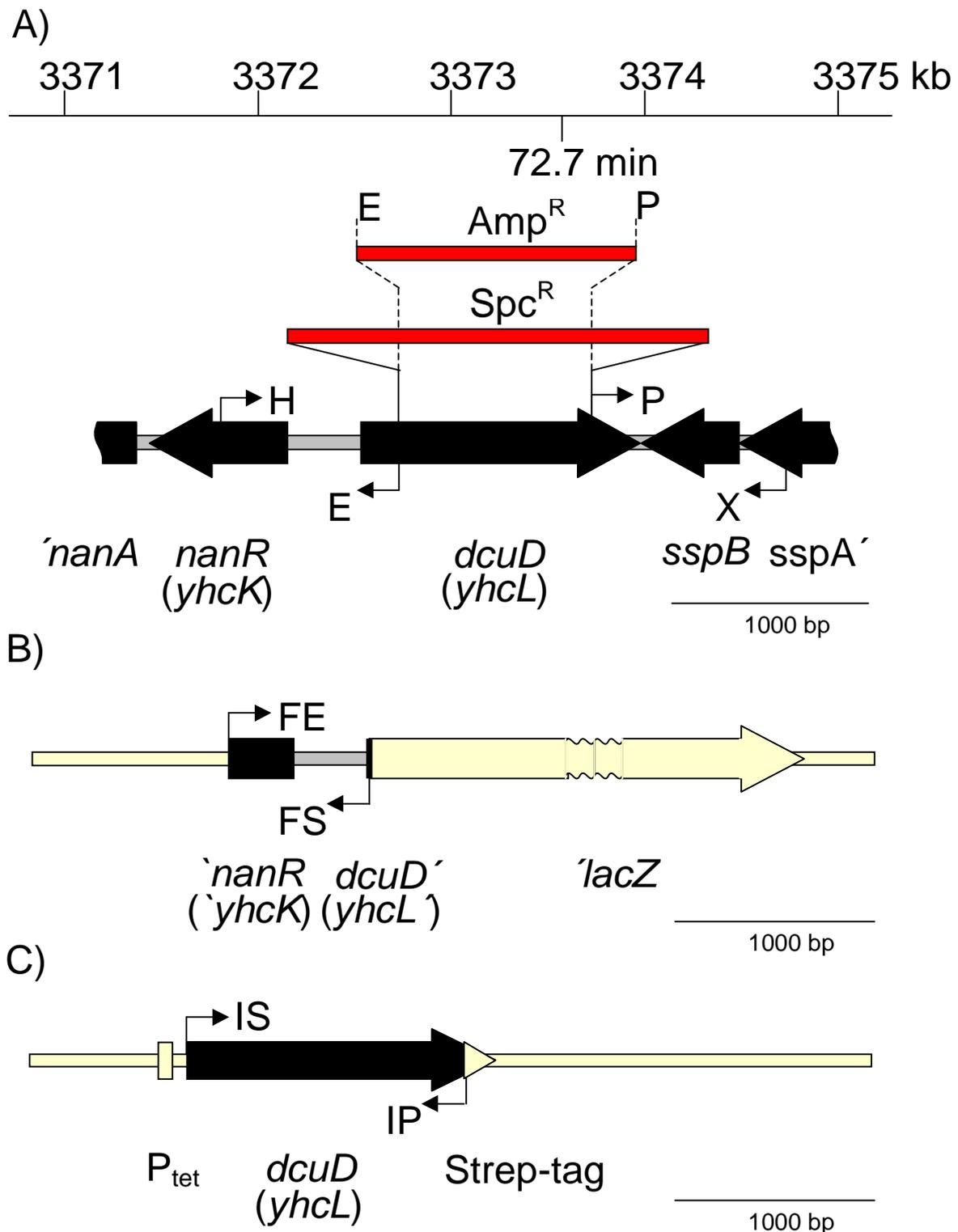


Abb. 4: Chromosomaler Bereich von *dcuD* (*yhcl*) und verschiedene *dcuD*-Konstrukte. A) Lage von *dcuD* in der *nanA*-*sspA* Region auf dem *E. coli* Chromosom. Die inserierten Resistenzkassetten ( $amp^R$ ,  $spc^R$ ) der Plasmide pMW83 und pMW97 sind angegeben. Die Positionen auf dem Chromosom sind in Kilobasen und Minuten angegeben. B) Konstrukt der *dcuD*'-*lacZ* Fusion von Plasmid pMW86 und pMW86a. C) Aufbau des *dcuD* Fusionsplasmids pMW146: Die Positionen des  $P_{tet}$  Promotors und des Strep-tag sind eingezeichnet. Primer zur Amplifikation der DNA-Fragmente: H YHCLHind/1, E YHCLEco24, P YHCLPst26, X YHCLEndeXba24, FE F-Eco27, FS F-Sal32, IS I-Sal29 und IP I-Pst34

Zur Überproduktion der periplasmatischen Domäne von DcuS, wurde der zentrale Bereich von *dcuS*, der für die periplasmatischen Domäne codiert, in pET28a (Novagen) hinter einen T7 Promotor kloniert.

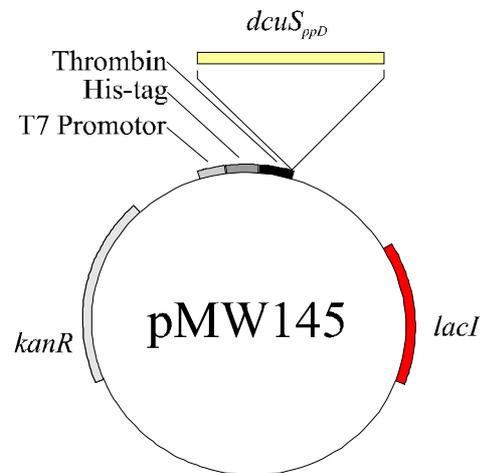


Abb. 5: Eigenschaften des Überexpressionsplasmids pMW145. Die Expression der periplasmatischen Domäne von *dcuS* steht unter Kontrolle eines T7 Promotors. 5'-terminal schließt sich an das Gen *dcuS<sub>ppD</sub>* die DNA-Sequenz für einen His-tag und eine Thrombinschnittstelle an.

Die periplasmatische Domäne von DcuS wurde mit den Primern *pdcuS*-Nde2 und *pdcuS*-Hind durch PCR amplifiziert. Mit den eingefügten Schnittstellen *NdeI* und *HindIII*, wurde das Fragment in pET28a (Novagen) kloniert (Abb. 5). Mit dem so konstruierten Expressionsplasmid (pMW145) konnte *DcuS<sub>45-180</sub>* überproduziert werden. Die Überproduktion der periplasmatischen Domäne wurde durch Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einem Wirtstamm induziert, der über eine chromosomale Kopie der T7 RNA Polymerase unter Kontrolle des *lac*-Promotors verfügte. Das Protein *DcuS<sub>45-180</sub>* umfaßt den periplasmatischen Bereich von DcuS, von Aminosäure 45 bis 180 (ohne die Transmembranhelices) und zusätzlich einen N-terminalen His-tag und eine Thrombinspaltstelle. Der klonierte Bereich von DcuS wurde durch Sequenzierung überprüft (Abb. 6).

**NMGSSHHHHHSSGLVPRGSHMS<sub>45</sub>DMTRDGLANKALAVARTLADSPEIRQGLQKK**  
 PQESGIQAI AEAVRKRNDLLFIVVTDMSLRYSHPAQ RIGQPFGDDILKALNGEE  
 NVAINRGFLAQLRVFTPIYDENHKQIGVVAIGLELSRVTQQINDSR<sub>180C</sub>

Abb. 6: Aminosäuresequenz von *DcuS<sub>45-180</sub>*. Das Derivat umfaßt die Aminosäurereste 45 bis 180. Das Protein besitzt N-terminal einen His<sub>6</sub>-tag (fett) mit einer Thrombinspaltstelle (unterstrichen). Die Aminosäuresequenz, die aus *DcuS* stammt ist schwarz dargestellt. Die Indices beziehen sich auf die Position der Aminosäuren in *DcuS*.

Zur Überproduktion der mutierten periplasmatischen Domänen wurde die Expressionsplasmide in gleicher Weise konstruiert, für die Primer pdcuS-Nde2 und pdcuS-Hind dienten jedoch die Plasmide mit mutiertem DcuS (pMW182, pMW183 und pMW184) als Template.

Das Expressionsplasmid pMW151 wurde zur Überproduktion des kompletten DcuS konstruiert. Mit dem Oligonukleotidpaar DcuS-N und DcuS-C wurde *dcuS* amplifiziert und über die neu eingefügten Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* in pET28a (Novagen) kloniert (Abb. 7) Das Konstrukt umfaßt die gesamte kodierende Sequenz von *dcuS*. Die Expression von DcuS erfolgt über einen induzierbaren T7 Promotor mit einem N-terminalen His-tag.

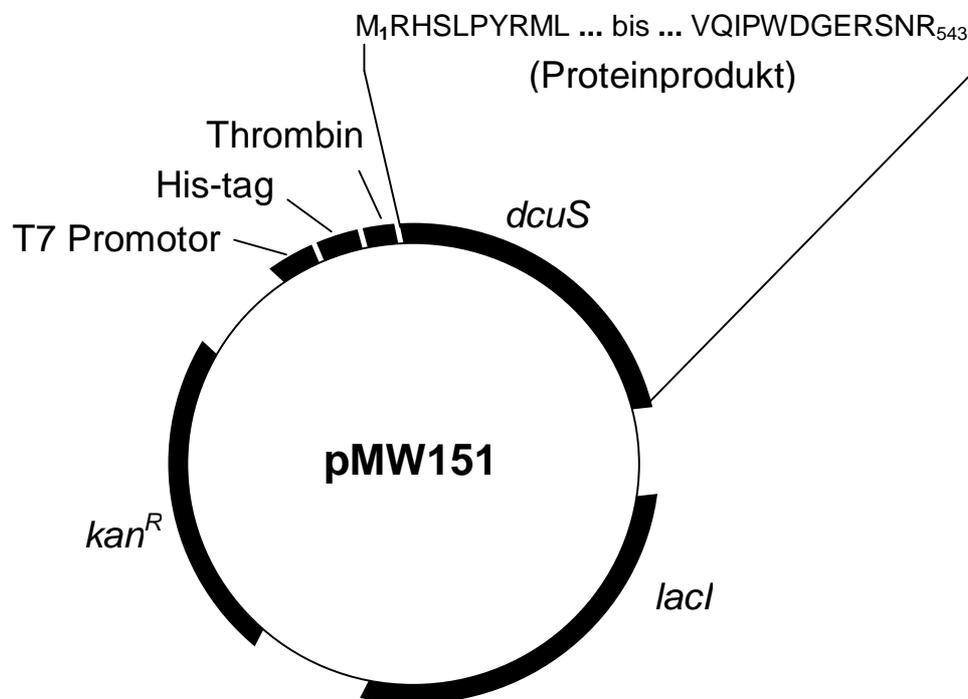


Abb. 7: Eigenschaften des His<sub>6</sub>-DcuS Überexpressionsplasmids pMW151. Die Expression von *dcuS* steht unter Kontrolle eines T7 Promotors. Es wurde das komplette Gen *dcuS* kloniert. 5'-terminal schließt die DNA-Sequenz für einen His-tag und eine Thrombinschnittstelle an.

Die Überproduktion von DcuR erfolgte ebenfalls in pET28a (Novagen). Dazu wurde das komplette Gen *dcuR* mit dem Oligonukleotidpaar pDcuR-Nde-22 und pDcuR-Hind-22 amplifiziert. Die Klonierung des 0,7 kb Fragments erfolgte über die neu eingeführten Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII*. Mit dem so konstruierten Expressionsplasmid (pMW180) konnte DcuR als Fusionsplasmid mit einem N-terminalen His-tag überproduziert werden. Die Konstruktion ist in Abb. 8 gezeigt.

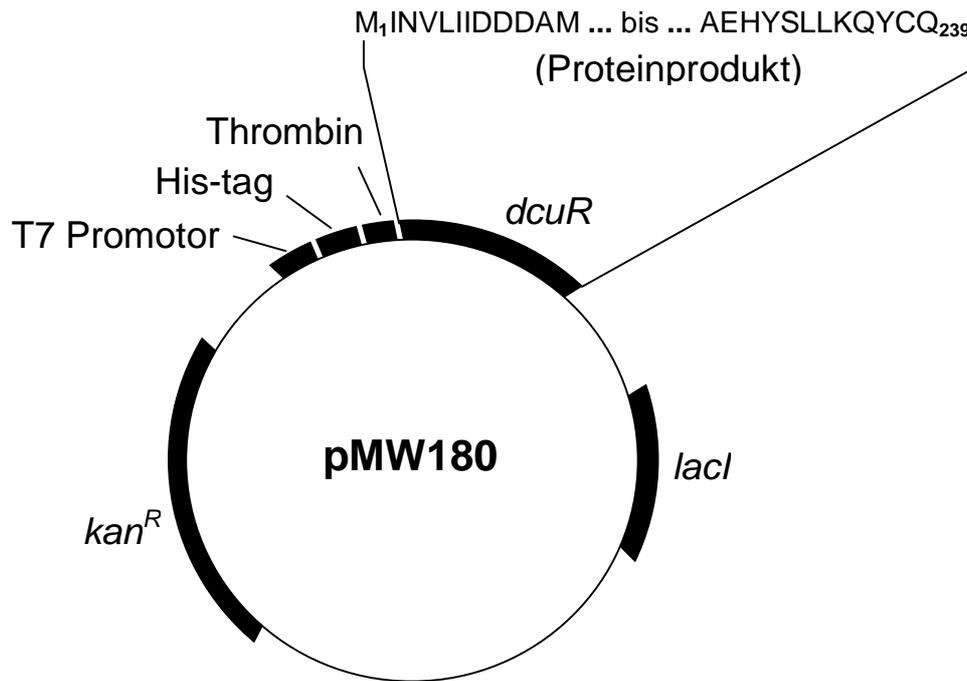


Abb. 8: Eigenschaften des His6-DcuR Überexpressionsplasmids pMW180. Die Expression von *dcuR* steht unter Kontrolle eines T7 Promotors. Es wurde das komplette Gen *dcuR* kloniert. 5'-terminal schließt die DNA-Sequenz für einen His-tag und eine Thrombinschnittstelle an.

### Mutagenese von DcuS

Zur Konstruktion von Punktmutanten wurde das Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Es wurde die DNA-Sequenz so mutiert, daß anstelle der Aminosäuren Arginin 139 und 147 Isoleucin trat. Es wurden Einzel- und Doppelmutanten hergestellt. Als Primer wurden Mut-R-A-28-For und Mut-R-A-28-Rev (für R139I), Mut-R-B-28-For und Mut-R-B-28-Rev (für R147I) und Mut-R-AB-45-For und Mut-R-AB-45-Rev (für die Doppelmutante) verwendet. Die Mutagenese wurde sowohl mit dem Plasmid pMW151 (Überexpressionsplasmid von DcuS), als auch mit pMW181 (DcuS mit eigenem Promotor) durchgeführt. So entstanden die Plasmide pMW182 bis pMW187. Der Bereich der periplasmatischen Domäne der *dcuS* Mutanten wurde mit dem Primerpaar I-Sal29 und I-Pst34 amplifiziert und mit den eingefügten Restriktionsschnittstellen *SalI* und *PstI* in pASK-IBA1ca (IBA) kloniert. So wurden die Plasmide pMW188 (DcuS<sub>45-180</sub>, aber R139I), pMW189 (DcuS<sub>45-180</sub>, aber R147I) und pMW190 (DcuS<sub>45-180</sub>, aber R139I und R147I), erhalten. Die Mutanten wurden durch Sequenzierung überprüft.

### Transduktion mit P1<sub>kc</sub>-Phagen

Es wurden LB-Kulturen der Donorstämme mit MC-Puffer (10 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) versetzt und 30 min bei 37°C geschüttelt. Von der Bakteriensuspension wurden 100 µl mit gleichem Volumen P1<sub>kc</sub>-Phagenverdünnung 15 min bei 37°C inkubiert, mit R-Top-Agar auf einer R-Agarplatte ausplattiert und bis zur konfluenten Lyse bei 37°C bebrütet. Nach Zugabe von 2 ml LB-Medium wurde der Top-Agar in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 0,5 ml Chloroform versetzt. Die Zellen wurden nach 10 min abzentrifugiert (10000 x g, 15 min, 4°C) und der Überstand mit 50 µl / ml Chloroform bei 4°C gelagert. Der Titer dieses transduzierenden Phagenlysats betrug ca. 10<sup>10</sup> p.f.u. (plaque forming units).

Zur Transduktion wurde der Rezipientenstamm mit MC-Puffer 30 min bei 37°C geschüttelt. Zu 100 µl dieser Suspension wurden 100 µl Phagenlysats und 10 µl CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) gegeben und erneut 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml LB-Medium und 0,2 ml Na<sub>3</sub>-Citrat (0,1 M) wurden weitere 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Selektivplatten ausplattiert. Über Nacht entstandene Kolonien wurden dann auf erfolgreiche Transduktion überprüft. Aus Stämmen mit entsprechender Resistenz wurde das betreffende DNA Fragment mittels PCR amplifiziert und dessen Länge mit Agarosegelelektrophorese überprüft.

### Southern-Analyse

Zur Überprüfung des Genotyps von IMW208 (*dcuD::spc<sup>R</sup>*) wurde die genomische DNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *PstI* geschnitten und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA über Nacht auf eine Nylonmembran geblottet und nach dem Trocknen durch 3 min UV-Bestrahlung bei 254 nm fixiert. Als Sonden wurde die Spectinomycin-Kassette aus pGS606 und das PCR-Produkt der Oligonukleotide M-Pst24 und M-Hind24 verwendet. Die Sonden wurden mit dem DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer, Mannheim) durch Random Priming markiert und immunologisch nachgewiesen.

### Komplementierung des anaeroben Wachstums von *dcu* Mutanten

Für die Komplementationsversuche wurde das Plasmid zur Überexpression von *dcuD* (pMW146) in die Stämme IMW153 (*dcuA dcuB dcuC*) und IMW277 (*dcuA dcuB dcuC citT*) transformiert. Die erhaltenen Stämme wurden auf ihr Wachstum mit Fumarat (IMW153) oder Glycerin und Citrat (IMW277) getestet. Dazu wurden die

Vorkulturen anaerob in LB-Medium gezüchtet und bei  $OD_{578nm}$  von 0,6 für 3 Stunden mit 200 ng / ml Anhydrotetracyclin (AHT) induziert. Vor und nach der Induktion wurde 1 ml der Kultur entnommen und die Überproduktion mit SDS-PAGE überprüft. Die Hauptkulturen wurden in M9-Medium und der entsprechenden C-Quelle anaerob inkubiert. Es wurde mit 2 % der induzierten Vorkultur angeimpft und auch in der Hauptkultur 200 ng / ml AHT zugegeben. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt.

### DNA Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden entweder von der Firma Genterprise (Mainz) oder der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt.

### **Biochemische Methoden**

Messung der Dicarboxylataufnahme

<u>Lösungen</u> :	100 mM	KPi-Puffer ( 100 mM $Na_2HPO_4$ -Puffer, pH 7)
	1 mM	$MgSO_4$
	0,5 mM	Laktat
	1 M	Glucose
	10 mM	1,4- $[^{14}C]$ -Fumarat (American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, USA, 9,25 MBq, 55 mCi / mmol)
	10 mM	2,3- $[^{14}C]$ -Succinat (Moravek, Brea, USA, 9,25 MBq, 44 mCi / mmol)
	oder	2,3- $[^{14}C]$ -Succinat (Amersham, Buckinghamshire, England, 7,4 MBq, 114 mCi / mmol)
	oder	2,3- $[^{14}C]$ -Succinat (Sigma, 7,4 MBq, 4,8 mCi / mmol)
	0,1 M	LiCl (Stopplösung)

Scintillationslösung (Rotiscint ecoplus, Roth)

### Herstellung der Zellsuspension

Die aerobe Zucht der Zellen erfolgte in M9-Medium mit 50 mM Succinat oder Glucose und Fumarat. Die Zellen wurden in der spätlogarithmischen Phase geerntet. Die Zellen wurden 20 min ( $10000 \times g$ ,  $4^\circ C$ ) abzentrifugiert und mit Puffer A (100 mM KPi-Puffer, 1 mM  $MgSO_4$ , pH 6) gewaschen. Mit Puffer A wurde eine Zellsuspension  $OD_{578nm}$  von 6,6 hergestellt. Zur Energetisierung wurden die Zellen 20 min mit 20 mM Lactat bei  $37^\circ C$  inkubiert.

### Transportmessungen

Von einer [<sup>14</sup>C]-Fumarat- oder [<sup>14</sup>C]-Succinatlösung wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß 50 µl vorgelegt und auf 37°C erwärmt. Die spezifische Aktivität betrug 3300 bzw 4800 dpm / nmol. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 µl energetisierter Zellsuspension. Die Endkonzentration des radioaktiven Substrates lag zwischen 10 µM und 5 mM. Nach einer Minute wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 0,1 M LiCl-Lösung (20°C) gestoppt und die Zellen mit einem Vakuum-Filtrationsgerät (FH 225V Ten-Place Filter Manifold, Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) filtriert. Dazu wurden die Membranfilter aus Cellulosenitrat (Ø 25 mm, 0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell) vor der Filtration mit 0,1 M LiCl-Lösung befeuchtet. Nach der Filtration wurden die Zellen auf dem Filter dreimal mit 1 ml 0,1 M LiCl-Lösung (20°C) gewaschen.

### Bestimmung der Radioaktivität in der Zelle

Die Membranfilter wurden in Probenröhrchen mit 4 ml Scintillationslösung überführt. Die Radioaktivität wurde im Scintillationszähler (Liquid Scintillation System, LS 6000SC, Beckman) bestimmt. Zur Bestimmung der Aufnahmeaktivität wurde für jede Substratkonzentration ein Blindwert (unspezifische Bindung) bestimmt. Dazu wurden im Reaktionsgefäß die 1 ml Stopplösung (0,1 M LiCl) mit dem [<sup>14</sup>C]-Substrat vorgelegt, und dann erst die Zellen zugegeben.

### Berechnung der Aufnahmeaktivität

Von den gemessenen dpm-Werten der Proben wurden der jeweilige Blindwert abgezogen und die Transportaktivität in U / g (µmol / min / g TG) angegeben.

Die gemessenen Radioaktivität bezieht sich auf 92,73 µg TG der Zelle, da für jede Probe 50 µl Zellsuspension OD<sub>578nm</sub> von 6,6 verwendet wurde (OD<sub>578nm</sub> von 1 entspricht 281 mg TG / l). Die Radioaktivität der [<sup>14</sup>C]-Fumaratlösung betrug 3300 dpm / nmol. Die Aufnahmeaktivität kann wie folgend berechnet werden:

$$U / g (\mu\text{mol} / \text{min} / \text{g}) = \frac{(\text{gemessene Radioaktivität der Probe} - \text{BW}) [\text{dpm} / \text{min}] \times 1000}{3300 \text{ dpm} / \text{nmol} \times 92,73 \mu\text{g}}$$

### Liposomenherstellung und Diffusionsmessung

Liposomen wurden aus Sojabohnenphospholipiden (90 - 96 %, ICN, Ohio, USA) oder aus Phospholipidgemisch von *E. coli* (Polar Lipid Extract, 20 mg / ml in Chloroform gelöst, Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) hergestellt.

Sojabohnenphospholipide (50 mg) wurden in 50 ml Chloroform / Methanol (2 : 1, v/v) gelöst und dann unter Stickstoffbegasung bei Raumtemperatur getrocknet. Der Lipidfilm wurde in 5 ml Puffer (20 mM Tris / HCl, pH 5, 6 oder 8, mit 80 mg N-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Gerbu), 4°C) resuspendiert und gegen 2 x 1 Liter Puffer (10 mM Tris / HCl, pH 5, pH 6 oder pH 8) für 36 Stunden bei 4°C dialysiert. Die Suspension wurden dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur langsam wieder aufgetaut.

Phospholipide von *E. coli* (50 oder 100 mg) wurden im Rotationsverdampfer getrocknet und in 5 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer mit 80 mg N-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid (Gerbu) resuspendiert und gegen 3 x 1 Liter 20 mM Kaliumphosphatpuffer dialysiert. Die Suspension wurden dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur langsam wieder aufgetaut.

Für die Messung der Aufnahme durch Diffusion wurden 298  $\mu$ l Liposomenlösung mit 52  $\mu$ l Wasser und 350  $\mu$ l Substrat ( $[^{14}\text{C}]$ -Fumarat (3300 dpm / nmol),  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat (4800 dpm / nmol),  $[^{14}\text{C}]$ -Glycerin (4400 dpm / nmol, (ICN), 1,85 MBq, 1,48 GBq / mmol),  $[^{14}\text{C}]$ -Phenylalanin (400 dpm / nmol), oder  $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]$ -ATP (2200 dpm / nmol, (Hartmann Analytic), 10 MBq, 110 TBq / mmol)) bei 37°C inkubiert. Nach 1 Minute wurden 100  $\mu$ l Probe entnommen und mit 1 ml 0,1 M LiCl Stopplösung versetzt.

Die Messung erfolgte wie bei den Zellsuspensionen. Für die Effluxmessungen wurden 90  $\mu$ l der Liposomenlösung mit 10  $\mu$ l Substrat (Endkonzentration 10 mM) versetzt und zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur langsam wieder aufgetaut. Von dieser Lösung wurden 10  $\mu$ l in 990  $\mu$ l Puffer verdünnt und die interne Substratkonzentration wie bei den Zellsuspensionen bestimmt.

### Herstellung der Zellsuspension für die HPLC Bestimmung

Zur Untersuchung der Kinetik des Efflux erfolgte die Zucht unter anaeroben Bedingungen in M9-Medium mit Glucose. Die Zellen wurden bei einer  $\text{OD}_{578\text{nm}}$  von 0,8 bis 1,0 geerntet. Nach der Abzentrifugation (bei 6000 Upm, 10 min, 30°C) wurden die Zellen mit anaerobisierten und auf 30°C vorgewärmten MOPS-Medium gewaschen. Alle Schritte wurden bei 30°C durchgeführt. Nach dem Waschen wurden die Zellen in

MOPS resuspendiert, so daß die  $OD_{578nm}$  bei 5,0 lag. Die Zellsuspension wurde in Sorvirellröhrchen überführt, erneut anaerobisiert und mit Stickstoff begast.

Die anaerobisierte Zellsuspension (5 ml) und die anaerobisierte 20 mM Glucoselösung (Glucose in MOPS) wurden in Sorvirellröhrchen bei 30°C inkubiert. Der Start der Kinetik erfolgt durch Zugabe von 5 ml der 20 mM Glucoselösung zur Zellsuspension, sodaß die Zellsuspension eine  $OD_{578nm}$  von 2,5 hatte. Vor der Zugabe ( $t_0$ -Wert) und nach der Zugabe von Glucose (10 sec, 30 sec, 1 min, 2 min, 4 min, 7 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 60 min, 90 min) wurden 700 µl der Suspension mit einer Kanüle entnommen und möglichst schnell abzentrifugiert (16000 x g, 1 min). Die Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und nochmals abzentrifugiert (16000 x g, 15 min). Erneut wurden die Überstände in Eppendorfgefäße überführt und für die Analyse durch HPCL bei -20°C eingelagert.

#### Analyse von Stoffwechselprodukten mit HPLC

Von den Zuchten in MOPS-Medium wurden Proben direkt nach dem Animpfen und in der spätlogarithmischen Phase genommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und die Überstände untersucht. Die HPLC-Säule (Aminex HPX87H, 300 x 7,8 mm, Biorad, München) arbeitete bei einer Betriebstemperatur von 65°C und einer Flußrate in der mobilen Phase von 550 µl / min. Es wurden die Substanzen Acetat, Citrat, Ethanol, Formiat, Fumarat, Glucose, Glycerin, Laktat, Malat, Pyruvat und Succinat mit einem Refraktometer und einem Photometer (215 nm) detektiert und quantifiziert.

#### Bestimmung der Succinatbildungsrate in der Zelle

Der lineare Bereich der Succinatbildung in allen Stämmen, 10 min bis 60 min nach der Inkubation mit Glucose, wurde zur Bestimmung der Succinatbildungsrate verwendet. Die Konzentrationen beziehen sich auf 1 Liter Zellsuspension mit einer  $OD_{578nm}$  von 2,5. Eine  $OD_{578nm}$  von 1,0 entspricht für *E. coli* 280 mg TG / l. Eine Zellsuspension von *E. coli* mit 1 mg TG hat ein cytoplasmatisches Volumen 2,51 µl (Engel *et al.*, 1992). Die Succinatbildungsrate in der Zelle wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{280 \text{ mg TG} \times 2,15 \text{ µl} \times OD 2,5}{\text{Zellsuspension (l)} \times \text{mg TG} \times OD 1,0} = \frac{1,5 \text{ ml Cyt. Volumen}}{\text{Zellsuspension (l)}}$$

$$\text{Succinatbildungsrate in der Zelle} = \frac{\text{Succinat (µM)}}{\text{min}} \times \frac{\text{Zellsuspension (l)}}{1,5 \text{ ml Cyt. Volumen}}$$

(µMol / ml / min)

### Proteinreinigung von DcuS<sub>(45-180)</sub>-His<sub>6</sub>

Zur Überproduktion der periplasmatischen Domäne von DcuS (DcuS<sub>45-180</sub>), wurde pMW145 in *E. coli* BL21DE3 transformiert. Die Zellen wurden in 1,2 Liter LB Medium oder isotopenmarkiertem M9-Medium gezüchtet. Es wurden 2 Liter Schikanenkolben verwendet und mit maximal 400 ml befüllt. Die Kulturen wurden aerob bei 30°C inkubiert. Bei einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5 wurde die Expression mit 1 mM IPTG (Roth) induziert. Nach 3 Stunden Inkubation war in der Regel eine OD<sub>578nm</sub> von 1,3 erreicht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (8 min bei 6000 Upm, Sorvall GS3 Rotor, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde mit Puffer 1 (50 mM Na / K-P<sub>i</sub>-Puffer, pH 7,0 200 mM NaCl, 10 mM Imidazol) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 30 ml Puffer 1 resuspendiert. Die Zellen wurden in zwei Durchgängen in der French Presse aufgeschlossen. Das Zellhomogenat wurde durch Zentrifugation (20 min, 4°C, 12000 Upm Sorvall SS34 Rotor) in lösliche und nicht lösliche Fraktionen getrennt. Das lösliche Protein DcuS<sub>45-180</sub> befand sich im Überstand des Zellhomogenats.

Das Protein wurde durch Affinitätschromatographie an einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose Säule (Qiagen) gereinigt. Das Säulenvolumen betrug 3 ml. Dieses Säulenvolumen reichte zur Reinigung von bis zu 30 mg His<sub>6</sub>-markiertem Protein. Die Säule wurde mit 10 Volumen Puffer 1 equilibriert und anschließend das Zellhomogenat des Produktionsstammes aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 Volumen Puffer 2 (50 mM Na / K-P<sub>i</sub>-Puffer, pH 7,0, 200 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 30 ml Puffer 3 (50 mM Na / K-P<sub>i</sub>-Puffer, pH 7,0, 200 mM NaCl, 500 mM Imidazol) eluiert. Der Proteingehalt der Proben wurde durch UV-Absorption bei 280 nm überwacht. Zur Reinigung wurde ein Chromatographiesystem (Econosystem, Biorad) verwendet. Nach Elution mit Puffer 3 wurden 6 - 7 Fraktionen von jeweils 1 ml mit einem Protein-gehalt von 1 - 6 mg / ml erhalten. Die proteinhaltigen Proben wurden in einen Dialyseschlauch gegeben (MWCO 10.000, ZelluTrans, Roth), und 3 h gegen 100 Volumen Puffer 4 (50 mM Na / K-P<sub>i</sub>-Puffer, pH 6,5, 200 mM NaCl, 5 mM Imidazol) dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung in ein Vivaspin 6 ml Concentrator Röhrchen (Ausschlußgröße 10.000 MWCO, Vivascience, Satorius) gegeben und für ca. 30 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Auf diese Weise wurde die Proteinlösung auf 15 - 25 mg / ml konzentriert. Die hochkonzentrierte Proteinlösung wurde aliquotiert (jeweils 300 µl), in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80°C gelagert. Je nach Präparation wurden 300 bis 900 µl Proteinlösung erhalten.

Die Proteinreinigung der mutierten periplasmatischen Domäne von DcuS erfolgte wie beim Wildtyp (DcuS<sub>45-180</sub>), aber mit den Plasmiden pMW188, pMW189 und pMW190. Für die NMR-Spektroskopie wurden der konzentrierten Probe 10 % D<sub>2</sub>O, 50 mM Glycin, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 0,8 mM CHAPS und 15 µM Pefabloc zugesetzt.

Bei Bedarf wurde der His-tag an der Thrombinschnittstelle abgespalten. Es wurden 300 µl der hochkonzentrierten Proteinlösung (s.o.) mit 700 µl Puffer 1 verdünnt und mit Thrombin Protease (Amersham, Pharmacia Biotech) (20 U / mg Protein) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Proteinverdau wurde durch Affinitätschromatographie an einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose Säule (Qiagen) gereinigt. Dabei wurde der abgespaltete His-tag an die Säule gebunden und das Protein konnte mit Puffer 1 (ohne Imidazol) eluiert werden. Es wurden 6 - 9 Fraktionen von jeweils 1 ml erhalten, vereinigt und mit Vivaspin 6 ml Concentrator Röhrchen (s.o.) aufkonzentriert.

Für einige NMR-Experimente wurde das Wasser der Probe vollständig gegen Deuteriumoxid (99,9 %, Deutero GmbH, Kastellaun) ausgetauscht. Dazu wurden 300 bis 900 µl der hochkonzentrierten Proteinlösung (s.o.) in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Probe wurde 45 min gefriergetrocknet (Lyovac GT2, Leybold-Heraeus) und ohne Zusätze in D<sub>2</sub>O (1 ml) resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Beim dritten Durchgang wurde die Probe ein Stunde bei 4°C mit 1 ml D<sub>2</sub>O inkubiert und dann wieder gefriergetrocknet. Das sollte den vollständigen Austausch von Wasser gegen Deuteriumoxid gewährleisten. Es folgte eine weitere Gefriertrocknung und dann wurde mit D<sub>2</sub>O eine Proteinkonzentration von 30 mg / ml eingestellt.

Die NMR-Spektroskopie wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Griesinger, Universität Frankfurt am Main durchgeführt.

#### Proteinreinigung von DcuR-His<sub>6</sub>

Zur Isolierung von DcuR wurde das Expressionsplasmid pMW180 in den *E. coli* Stamm BL21DE3 transformiert. Die Überexpression von DcuR wurde mit 1 mM IPTG (Roth) induziert und die Reinigung erfolgte in gleicher Weise wie die Reinigung von DcuS. Nach dem Zellaufschluß wurde jedoch die lösliche Fraktion mit der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Säule aufgetrennt und nicht die Membranfraktion. Aus einem Liter Kulturvolumen konnten 30 mg gereinigtes DcuR isoliert werden.

### Proteinreinigung von DcuS-His<sub>6</sub>

Zur Überproduktion von DcuS-His<sub>6</sub> wurde *E. coli* BL21DE3 mit pMW151 transformiert. Die Kulturen wurden aerob bei 30°C inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD<sub>578nm</sub> von 0,5 mit 1 mM IPTG (Roth). Nach drei Stunden Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (8 min bei 6000 Upm, Sorvall GS3 Rotor, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde mit Puffer 1 (50 mM Tris / HCl, pH 7,7 mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in Puffer 1 resuspendiert. Die Zellen wurden in drei Durchgängen in der French Presse aufgeschlossen. Ganze Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 9000 x g, Sorvall SS34 Rotor) abgetrennt. Vom Überstand wurde durch Ultrazentrifugation (TFT70.38 Rotor, 65 min, 4°C, 200.000 x g, Beckmann L7-65) die Membranfraktion erhalten. Die Membranen wurden zweimal mit 1 mM Tris / HCl pH 7,7 mit 3 mM EDTA gewaschen und in 50 mM Tris / HCl, pH 7,7 mit 10 % Glycerin homogenisiert. Die so erhaltene Membranfraktion (1,5 mg Protein / ml) wurde bei -80°C gelagert oder direkt verwendet. Zur Solubilisierung der Membranproteine wurde der Membranfraktion stufenweise Lauryldimethylamin-N-Oxid (LDAO, Fluka) oder Empigen BB (30 %, Calbiochem), bis zu einer Endkonzentration von 2 %, zugegeben. Die Solubilisierung erfolgte für 30 min auf Eis. Die Suspension wurde für 50 min bei 300.000 x g zentrifugiert, um unlösliche Anteile abzutrennen. Der Überstand mit gelöstem DcuS-His<sub>6</sub> wurde durch Affinitätschromatographie an einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose Säule (Qiagen) gereinigt. Das Säulenvolumen betrug 2 ml. Die Säule wurde mit 25 Volumen Puffer 2 (50 mM Tris / HCl, pH 7,7, mit 10 % Glycerin, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, 0,04 % Dodecylmaltosid) äqualibriert. Die Reinigung erfolgte bei 4°C und der Durchlauf durch die Säule wurde nur durch die Schwerkraft getrieben. Die Säule wurde mit 20 Volumen Puffer 2 gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 3 x 1 ml Puffer 3 (50 mM Tris / HCl, pH 7,7, mit 10 % Glycerin, 0,5 M NaCl, 100 mM Imidazol, 0,04 % Dodecylmaltosid) eluiert. Aus einem Liter Kulturvolumen konnten 3,75 mg gereinigtes DcuS isoliert werden.

### Rekonstitution von DcuS-His<sub>6</sub>

Liposomen (s.o.) aus *E. coli*-Phospholipidgemisch (Avanti Polar Lipids) wurden mit Dodecylmaltosid (0,58 % w / v) oder Triton X-100 (0,8 % w / v) destabilisiert. Es wurde gereinigtes DcuS-His<sub>6</sub> (in Elutionspuffer) zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Dabei wurde ein Konzentrationsverhältnis (Phospholipid zu

Protein) von mindestens 20 : 1 eingehalten. Zur Entfernung des Detergenz wurden Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad) verwendet. Dazu wurden die Bio-Beads, wie bei Holloway (1973) angegeben, vorbereitet. Sie wurden mit 100 % Methanol gewaschen und in 50 mM Tris / HCl, pH 7,7 mit 10 % Glycerin bei 4°C gelagert. Zur Entfernung von Luftblasen aus den Bio-Beads wurde die Suspension anaerobisiert. Pro mg Triton X-100 oder Dodecylmaltosid wurden 5 bzw. 15 mg Bio-Beads zugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurden nochmal die gleiche Menge an frischen Bio-Beads zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Überstand wurde von den Bio-Beads abpipettiert und die Suspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### Phosphorylierung und Phosphotransfer

Es wurden 80 µl der Proteoliposomensuspension auf 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT und 20 mM Fumarat eingestellt. Die Proben wurden dann dreimal eingefroren und aufgetaut. Dabei wurden die Liposomen schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren, langsam bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und mindestens eine Stunde weiter bei Raumtemperatur inkubiert. Die so vorbereiteten Proteoliposomen wurden zur Phosphorylierung eingesetzt. Der Start erfolgte durch Zugabe von 2,5 µl unverdünntem [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP (Hartmann Analytic, 10 MBq, 110 TBq / mmol). Zu den angegebenen Zeiten wurden 10 µl Probe entnommen und mit 10 µl SDS-Proben-puffer gemischt. Zum Testen des Phosphotransfers wurde dem Ansatz gereinigtes DcuR zugegeben und weiterhin Proben genommen. Die Proben wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wurde das Gel auf 20°C gekühlt. In jeder Spur befand sich 2 µg DcuS und zum Teil noch 8 µg DcuR. Die Messung der Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Phosphoimagers durchgeführt und die Proteinfärbung der SDS-Gels erfolgte mit Coomassie. Für quantitative Messungen wurden die Proteinbanden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, in 30 % Wasserstoffperoxid aufgelöst (> 12 Stunden bei 46°C) und mit Scintillationslösung (Rotiscint ecoplus, Roth) versetzt. Die Radioaktivität wurde im Scintillationszähler (Liquid Scintillation System, LS 6000SC, Beckman) bestimmt.

### Messung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität

Die Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität wurde nach Miller (1992) durchgeführt. Für die anaerobe Zucht wurden 10 ml Kulturvolumen, für die aerobe Zucht 15 ml

Kulturvolumen eingesetzt. Die Zellen wurden während der exponentiellen Wachstums-phase bei einer  $OD_{578nm}$  von 0,5 - 0,8 geerntet. Alle  $\beta$ -Galactosidase-Tests wurden aus mindestens zwei unabhängigen Zuchten durchgeführt. Dabei wurden jeweils vier Parallelbestimmungen durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### I. Neue C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier in *E. coli*

#### Identifizierung und Charakterisierung von DcuD

*Escherichia coli* verfügt über zwei Transporterfamilien für den Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten unter anaeroben Zuchtbedingungen: die Dcu und die DcuC Familie. Die Dcu Familie besteht aus den Carriern DcuA und DcuB, die hohe Sequenzähnlichkeit (63 % identische Aminosäuren) aufweisen und vorwiegend für den Fumarat / Succinat Gegentausch verantwortlich sind. Die Funktion von DcuC hingegen scheint hauptsächlich im Efflux von Succinat zu liegen. Die Sequenz von DcuC zeigt nur geringe Homologie (13 % identische Aminosäuren) zu DcuA und DcuB, so daß DcuC eine eigene Familie bildet (Zientz *et al.*, 1996, Saier, 1998, 1999, Janausch *et al.*, 2001).

Durch Sequenzvergleiche konnte ein weiteres Gen (*yhcL*) auf dem *E. coli* Chromosom bei Minute 72 identifiziert werden (Abb. 4), das hohe Sequenzähnlichkeit zu DcuC aufweist (35 % identische Aminosäuren). Ähnlich hohe Homologien gibt es nur noch zu einem weiteren hypothetischen Gen aus *H. influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995) das aus zwei benachbarten Genen oder Genfragmenten (*y0585* und *y0586*) durch Fusion gebildet werden kann. Gemeinsam ist diesen drei Proteinen der typische Aufbau für sekundäre Transportproteine mit 10 - 12 vorhergesagten Transmembranhelices. Diese hohe Sequenzhomologie und die Eigenständigkeit der Gruppe, rechtfertigen die Eingliederung von YhcL in die DcuC Familie (Saier, 1999) und die Umbenennung in DcuD.

Die Eigenschaften von *dcuD* bzw. DcuD wurden eingehend untersucht. Hierzu wurden zunächst Mutanten konstruiert, bei denen *dcuD* auf chromosomaler Ebene deletiert wurde (Abb. 4). Solche *dcuD* Mutanten wurden auf ihr Wachstumsverhalten und den Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten untersucht. In Kombination mit *dctA* Mutanten wurde überprüft, ob DcuD unter aeroben Bedingungen aktiv ist. DctA ist der aerobe C<sub>4</sub>-Dicarboxylattransporter und gehört zur Familie der Dicarboxylat-Aminosäure: Kation-Symporter (DAACS). Außerdem wurde DcuD überproduziert und mit Laborstämmen und Naturisolaten wurden Expressionsstudien durchgeführt. Auf-

grund der hohen Sequenzähnlichkeit von DcuD zu DcuC wurde eine ähnliche Funktion der beiden Proteine vermutet. Da DcuC ein Succinat-Effluxcarrier in der Glucosefermentation ist, wurde auch eine Beteiligung am Succinatefflux unter fermentativen Bedingungen untersucht. Auch beim anaeroben Wachstum mit Glycerin und Citrat entsteht Succinat als Endprodukt (Lütgens *et al.*, 1980). In der Citratfermentation ist CitT ein Citrat / Succinat-Antiporter, der die Aufnahme von Citrat und den Export von Succinat katalysiert (Pos *et al.*, 1998). CitT gehört zur Familie der Divalent-Anion:Na<sup>+</sup>-Symporter (DASS). Ob DcuD den Antiporter CitT bei der Citratfermentation ersetzen kann, wurde ebenfalls getestet.

### Wachstumsverhalten von *dcuD* Mutanten

Die Konstruktion der *dcuD* Mutanten erfolgte durch Ersatz des zentralen Teils von *dcuD* durch eine Kasette für Spectinomycin- oder Ampicillinresistenz in das klonierte *dcuD* Gen (Abb. 4). Anschliessend wurde das chromosomale *dcuD* Gen durch die inaktivierte Kopie durch doppelte homologe Rekombination ersetzt (Oden *et al.*, 1990). Das Einfügen der Resistenzkassetten führte zu einer Vergrößerung des DNA-Abschnitts. Die Größe (4 kb) des mutierten Bereichs wurde durch PCR-Amplifikation und Southern-blot überprüft (Janausch, 1997). Durch Transduktion der *dcuD::amp<sup>R</sup>* Mutation in den Stamm IMW213b (*dctA dcuA dcuB dcuC*) mit dem Phagen P1, wurde die Fünffachmutante IMW244 (*dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*) konstruiert, in der alle bekannten Dicarboxylattransporter ausgeschaltet sind.

Eine *dcuA dcuB dcuC* Mutante wächst nicht mehr anaerob mit Glycerin und Fumarat (Zientz *et al.*, 1996) und eine *dctA* Mutante nicht mehr aerob mit Fumarat, zeigt aber noch geringes Wachstum mit Succinat (Davies *et al.*, 1999). Die Vierfachmutante (*dctA dcuA dcuB dcuC*) zeigte ebenfalls noch geringes Wachstum mit Succinat unter aeroben Bedingungen. Es wurde daher überprüft, ob DcuD für diesen restlichen Transport verantwortlich ist oder am Transport von verwandten Substraten (andere Mono- oder Dicarboxylate) beteiligt ist. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum von *dcuD* Mutanten auf entsprechenden Substraten mit ihren jeweiligen Ausgangsstämmen verglichen. Beim aeroben Wachstum mit Dicarbonsäuren wurde IMW213b (*dctA dcuA dcuB dcuC*) als Vergleichsstamm der Fünffachmutante gewählt, um zu verhindern, daß der aerobe Dicarboxylatcarrier DctA einen Transport durch DcuD überdeckt. Beim Wachstum auf anderen Substraten, wurde die *dcuD* Mutante

(IMW208) mit dem Wildtyp (AN387) verglichen. Unter anaeroben Bedingungen waren zusätzlich die *dcu* Carrier inaktiviert (Tab. 3). Die *dcuD* Mutanten zeigten jedoch im aeroben Wachstum keinen signifikanten Unterschied gegenüber den Vergleichsstämmen in Wachstumsertrag oder Wachstumsrate mit Dicarboxylaten.

Insbesondere über den Transport von Monocarboxylaten und die zuständigen Carrier ist in *E. coli* bislang wenig bekannt. Auch bei aerober Zucht auf diesen Substraten zeigte sich die Mutante gegenüber dem Wildtyp nicht benachteiligt. *E. coli* kann nicht nur Mono- und Dicarboxylate, sondern auch verwandte Substrate, wie beispielsweise Aminosäuren, als Substrate zur Energiegewinnung und als Kohlenstoffquelle nutzen. Doch auch mit Aminosäuren zeigte die *dcuD* Mutante keinen Effekt im Wachstumsverhalten.

Diese Wachstumsversuche zeigten, daß DcuD weder für das Wachstum mit Substraten, die von Carriern der Dcu und DcuC Familien erkannt werden (Dicarboxylate verschiedenster Art), noch für das Wachstum mit Monocarboxylaten oder Aminosäuren essentiell ist.

### **Expressionsstudien von *dcuD* aus *Escherichia coli* K-12**

Viele Carrier werden erst in Anwesenheit ihrer Substrate gebildet. Deshalb sollte durch Expressionsmessungen von *dcuD* versucht werden potentielle Substrate von DcuD zu identifizieren. Da die Expression mit geeigneten Reporter genen sehr empfindlich gemessen werden kann, ist es möglich, mit dieser Methode den Einfluß vieler verschiedener Substrate zu bestimmen. Für diesen Zweck wurde eine *dcuD*'-'*lacZ* Reporter genfusion konstruiert und mit Hilfe des Phagen  $\lambda$ RZ5 ins Genom integriert.

Mit dem *dcuD*'-'*lacZ* Reporter genstamm wurden über 50 verschiedene Substrate und Bedingungen getestet. An Substraten wurde eine Vielzahl verschiedener Mono-, Di- und Tricarbonsäuren, Zuckersäuren, Aminosäuren und Dimethylsulfoxid getestet. Keines der Substrate konnte aber die Expression der *dcuD*'-'*lacZ* Fusion nennenswert induzieren (Tab. 3).

Zusätzlich wurde der Einfluß verschiedener Wachstumsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur, Salzkonzentration, oder Wachstumsphase getestet. Besonders der pH-Wert sollte beim Transport von Carbonsäuren wichtig sein, da er den Protonierungsgrad und somit die Ladung des Substrats verändert. Keine der getesteten Bedingungen führte allerdings zu einer Steigerung der Expression (Tab. 3).

Tab. 3: Expression von *dcuD'*-*lacZ* Fusion und Wachstum von Mutanten mit verschiedenen Substraten. Bei den Wachstumstests wurde die erzielte Zelldichte oder Wachstumsgeschwindigkeit der *dcuD* Mutante (IMW244) mit IMW213b (wie IMW244 aber *dcuD*<sup>+</sup>) verglichen. Dabei bedeutet „kein Effekt“, daß die Unterschiede kleiner als 20 % waren. Die Zucht erfolgte in M9-Medium mit den angegebenen Substraten. Die *dcuD'*-*lacZ*-Expressionsstudien wurden mit Stamm IMW259 durchgeführt.

Substrate und Bedingungen	Wachstum der <i>dcuD</i> Mutante	β-Galactosidaseaktivität (Miller Unit) von <i>dcuD'</i> - <i>lacZ</i>
<u>C4-Dicarboxylate:</u>		
Dicarbonsäuren + O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	kein Effekt <sup>g</sup>	≤6
Glycerin + Carbonsäuren <sup>b</sup>	kein Effekt <sup>h</sup>	≤3
<u>Andere Substrate:</u>		
Monocarbonsäuren <sup>c</sup> + O <sub>2</sub>	kein Effekt <sup>h</sup>	≤3
Aminosäuren <sup>d</sup> + O <sub>2</sub>	kein Effekt <sup>h</sup>	≤5
Glycerin + Aspartat	kein Effekt <sup>h</sup>	≤7
Aminozuckerderivate <sup>e</sup> + O <sub>2</sub>	n.d.	≤5
Asp-Ala <sup>f</sup>	n.d.	≤2
Glycerin + DMSO	n.d.	≤14
<u>Sonstige Bedingungen:</u>		
LB-Medium + O <sub>2</sub> , 30°C to 42°C	n.d.	≤3
LB-Medium + O <sub>2</sub> , 0 bis 400 mM NaCl	n.d.	≤3
LB-Medium + O <sub>2</sub> , verschiedene Wachstumsphasen	n.d.	≤3

<sup>a</sup> Succinat, Malat, Fumarat, Crotonat, Tartrat, Malonat + Glycerin, Maleinat + Glycerin, oder Diaminopimelinsäure

<sup>b</sup> Fumarat, Malat, Asparagin, Tartrat, Citrat, Mucal oder Orotat + Fumarat

<sup>c</sup> Formiat, Acetat (pH 6 bis 8), Propionat, Butyrat, Pyruvat, D(-)-Lactat, L(+)-Lactat, Acetoacetat, Gluconat, Muconat, Glucuronat oder Glycerin + Orotat

<sup>d</sup> Säurehydrolysiertes Casein

<sup>e</sup> Glycerin + 20 mM *N*-Acetylneuraminsäure, Glycerin + 20 mM *N*-Acetylmannosamin oder Glycerin + 20 mM *N*-Acetylmuraminsäure

<sup>f</sup> Aerobes (20 mM Asp-Ala + O<sub>2</sub>) oder anaerobes (Glycerin + Fumarat + 20 mM Asp-Ala) Wachstum

<sup>g</sup> Stamm IMW244 (*dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*) im Vergleich zu IMW213b (wie IMW244, aber *dcuD*<sup>+</sup>)

<sup>h</sup> IMW208 (*dcuD*) zu AN387 (*dcuD*<sup>+</sup>) und IMW209 (*dcuA dcuB dcuC dcuD*) im Vergleich zu IMW153 (wie IMW209 aber *dcuD*<sup>+</sup>)

n.d. nicht durchgeführt

In *E. coli* sind die Gene eines Stoffwechselweges oft in Operons, oder benachbart zueinander, organisiert. In der Nachbarschaft des *dcuD* Gens von *E. coli* und der *y0585* und *y0586* Gene von *H. influenzae*, werden Enzyme kodiert, deren Substrate potentielle Substrate für DcuD darstellen könnten. So befindet sich in der Nachbarschaft zu *dcuD* das *nanA* Gen, das für eine N-Acetylneuramin-Pyruvat-Lyase kodiert. Das *pepE* homologe Gen aus *H. influenzae*, das neben *y0585* und *y0586* liegt, kodiert für eine  $\alpha$ -Aspartyl-Dipeptidase. Die Transporter für  $\alpha$ -Aspartyl-Dipeptide sind nicht bekannt (Conlin *et al.*, 1994), und es bestand die Möglichkeit, daß DcuD einen entsprechenden Carrier darstellt. Somit wurde getestet, ob ein  $\alpha$ -Aspartyl-Dipeptid (Asp-Ala) die Expression von *dcuD* zu steigern vermag.

Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure, NANA) ist das Substrat der N-Acetylneuramin-Pyruvat-Lyase und wird zu N-Acetylmannosamin und Pyruvat gespalten (Vimr *et al.*, 1985). NANA ist damit Substrat für biosynthetische und katabole Prozesse, da es ein Substrat für die Zellwandsynthese und Pyruvat liefert. Ein Transporter für Sialinsäure (NanT, SHS-Familie) ist zwar bekannt (Martinez *et al.*, 1995), dennoch wurden Substrate dieser Klasse getestet, da für ein Substrat oft mehrere Transporter mit unterschiedlicher Affinität vorhanden sind. In Anwesenheit der entsprechenden Substrate zeigte sich jedoch keine deutliche Steigerung der Expression der *dcuD*'-'*lacZ* Fusion (Tab. 3).

Diese umfangreichen Experimente zeigen, daß weder Substrate der Dcu- und DcuC-Carrierfamilien (Carbonsäuren verschiedenster Art), noch Substrate von Enzymen, die von benachbarten Genen von *dcuD* kodiert werden, dessen Expression stimulieren oder DcuD zum Transport benötigen.

### **Expressionsstudien von *dcuD* aus Naturisolaten von *Escherichia coli***

Die geringe Expression von *dcuD* ließ vermuten, daß *dcuD* ein kryptisches Gen ist. Es wurde nun überprüft, ob auch frisch isolierte Naturstämme von *E. coli* solch geringe Expression von *dcuD* zeigen. Es gibt Hinweise darauf, daß während der Kultivierung von Laborstämmen die Expression mancher Gene durch Mutationen inaktiviert wird (Hall, 1988, Hall *et al.*, 1983). Deshalb wurde untersucht, ob das auch bei *dcuD* der Fall war.

Hierzu wurde aus einer Kläranlage ein *E. coli* Stamm isoliert und der Promotorbereich von *dcuD* sequenziert. Es zeigten sich nur wenige Punktmutationen gegen-

über den Laborstämmen AN387 und MG1655. Die Mutationen liegen hauptsächlich im Bereich des  $\sigma^{70}$  Promotors und von Position 208 bis 228 vor der codierenden Sequenz von *dcuD* (Abb. 9). Der *dcuD* Promotorbereich des Neuisolates wurde zur Konstruktion einer *dcuD<sub>nat</sub>'-lacZ* Fusion verwendet, die in ihrem Aufbau der Fusion aus dem Laborstamm AN387 (*dcuD'-lacZ*) entspricht. Die Expression dieser beiden *dcuD'-lacZ* Fusionen wurde verglichen. Dazu wurden die Fusionen auf einem Plasmid niedriger Kopienzahl in den Naturstamm oder AN387 gebracht. Nach Abzug der  $\beta$ -Galaktosidase-Hintergrundaktivität und Korrektur für die Plasmidzahl zeigten beide Fusionen nur sehr geringe Expression ( $\leq 3$  Miller Units / Kopie) unabhängig vom Wirtsstamm. Die Expression wurde hier ebenfalls in Anwesenheit verschiedener C<sub>4</sub>-Dicarboxylate unter aeroben und anaeroben Bedingungen getestet. Die Expression von *dcuD* ist also auch in Wildtyp *E. coli*-Stämmen gering, die frisch aus ihrer natürlichen Umgebung isoliert wurden.

### ***yhcK (nanR)***

◀TTCAT AAGGCCATTCTGTAAGGTCAGTGTGATTAACATCATCAGTGACA 50  
  
 TCCTAT **IHF** CACAGGATTGAAA GTAGGGGAAAA **T  $\sigma^{54}$**  TGGCAGGGTTTTCTCT TTGT 100  
  
 GCCTCATCATTACCATAATTAACGGAATAATTA ACTATTGCGAAAAATTA 150  
  
 ATGTAACGCAGATAAAAAACATCCCGTTTGAATTATTTATAAGACTATTCA 200  
  
 A  
 CGAGCATTATGAATATTATGAATGTGTTCTTACAAAATAATCATAAGCGC 250  
  
 ATATT **-35** TTTTAA TGAAAAATCACCTCAC **T C -10** TACAAT TAAAAACACGACATCC 300  
  
 C  
 GCACCATAAATAGCC-TTGCAAAAATATAACATCGTTGTTTTCAATCTG 350  
  
 CCGTTTATGGGATTGACCGTTTTCTTTTGACACGGAGTTCAACA ***dcuD*** ATGTGT▶ 400

Abb. 9: Promotorregion von *dcuD* von *Escherichia coli* MG1655 und *E. coli* Naturisolat IMW282. Die Sequenz stammt aus AN387, ist aber identisch zu MG1655 (Blattner *et al.*, 1997). Die Buchstaben über der Sequenz zeigen die Abweichungen in der Sequenz für IMW282. Der Beginn der kodierenden Sequenz für *yhcK (nanR)* (Plumbridge *et al.*, 1998) und *dcuD*, Bereiche mit Sequenzähnlichkeiten zu  $\sigma^{54}$ - und  $\sigma^{70}$ -Promotoren, sowie der IHF Konsensussequenz (YAANNNTTGATW, Y = C / T, W = A / T, Gamas *et al.*, 1987) sind eingezeichnet.

## Überproduktion von DcuD

Auf der Suche nach einer Funktion von DcuD wurde das Protein künstlich überproduziert. Dazu wurde *dcuD* hinter den induzierbaren *tet* Promotor des Plasmids pASK-IBA1ca kloniert. Nach Induktion mit Anhydrotetracyclin in Stamm AN387 mit dem *dcuD* Expressionsplasmid pMW146 zeigte sich im SDS-Gel des zellfreien Extraktes eine zusätzliche Bande bei 49 kDa dem erwarteten Molekulargewicht des DcuD Proteins. Die Intensität dieser Bande war vergleichbar mit den stärksten Banden anderer Proteine aus dem zellfreien Extrakt, und damit für einen Carrier sehr hoch. Größere Mengen von Membranproteinen können für die Zelle toxisch sein. Die Überproduktion konnte sowohl im Wildtyp, als auch in den Dcu Mutanten IMW153 (*dcuA dcuB dcuC*) und IMW277 (*dcuA dcuB dcuC citT*) nach aerober oder anaerober Zucht mit Glucose erreicht werden. CitT ist ein Citrat / Succinat Antiporter, der in der Citratfermentation die Aufnahme von Citrat und den Export von Succinat katalysiert (Pos *et al.*, 1998). CitT gehört zur Familie der Divalent-Anion:Na<sup>+</sup>-Symporter (DASS). IMW153 ist nicht mehr in der Lage anaerob mit Glycerin und Fumarat zu wachsen, während IMW277 nicht mehr mit Glycerin und Citrat wachsen kann. Mit dem *dcuD* Expressionsstamm wurde untersucht, ob die Überproduktion von DcuD den Ausfall der Transporter DcuA DcuB DcuC oder CitT komplementieren kann. Der Stamm IMW153 (*dcuA dcuB dcuC*) ist trotz Überproduktion von DcuD nicht in der Lage anaerob auf Glycerin und Fumarat zu wachsen. Deshalb ist DcuD nicht in der Lage, einen Fumarat / Succinat Antiport zu katalysieren. Der Stamm IMW277 (*dcuA dcuB dcuC citT*) kann trotz Überproduktion von DcuD anaerob nicht auf Glycerin und Citrat wachsen. DcuD ist daher nicht fähig, einen Citrat / Succinat Antiport zu katalysieren. DcuD kann also überproduziert werden, die Transporter DcuA, DcuB, DcuC oder CitT jedoch nicht komplementieren.

## Succinatbildung in der Glucosefermentation in *dcuC* und *dcuD* Mutanten

Unter fermentativen Bedingungen betreibt *E. coli* gemischte Säuregärung und produziert als Endprodukt bis zu 0,2 mol Succinat pro mol Glucose. Succinat kann von *E. coli* unter anaeroben Bedingungen nicht weiter umgesetzt werden und muß die Zelle verlassen. Bisherige Untersuchungen zeigten, daß DcuC bevorzugt als Efflux-carrier arbeitet und Succinat exportiert (Zientz *et al.*, 1999). Daher wird vermutet, daß hauptsächlich DcuC die Funktion des Succinatexports bei der Glucosefermentation

übernimmt. DcuC ist jedoch nicht der alleinige Effluxcarrier für Succinat. Die Ähnlichkeit von DcuD zu DcuC läßt für DcuD eine ähnliche Funktion erwarten. Es sollte deshalb überprüft werden, ob DcuD ein weiterer Succinateffluxcarrier ist, der DcuC ersetzen kann. Um eine mögliche Funktion von DcuD beim Succinatefflux nachzuweisen, wurden die Fermentationsprodukte analysiert, die vom Wildtyp und der Mutante beim Wachstum auf Glucose gebildet werden. Eine Doppelmutante (*dcuC dcuD*) sollte unter dieser Annahme deutlich weniger Succinat ins Medium ausscheiden als der Wildtyp oder eine *dcuC* Einzelmutante.

Bei Wachstum auf Glucose produzierte der Wildtyp (AN387) 0.23 mol Succinat / mol Glucose (Tab. 4). Die *dcuC* Mutante schied nur halb soviel Succinat aus, während die Doppelmutante wieder soviel Succinat produzierte wie der Wildtyp.

Es ist denkbar, daß bei Ausfall der Hauptcarrier für den Succinatefflux verwandte Carrier deren Funktion übernehmen können. Aus diesem Grund wurde die Succinatbildung in einem Stamm untersucht, dem neben DcuC und DcuD alle weiteren C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier (DctA, DcuA, DcuB) fehlen (Tab. 5). Für die Mutante IMW244 (*dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*) wurden die Endprodukte der Glucosefermentation bestimmt. Dabei erfolgte die Zucht bei pH-Werten zwischen 6 und 8. Der pH-Wert hatte nur geringen Einfluß auf die Fermentationsprodukte. Lediglich die Laktatmenge war bei pH 6 deutlich erhöht und dafür war etwas weniger Formiat zu finden. Die gebildete Succinatmenge lag hingegen unabhängig vom pH-Wert bei etwa 0.05 mol / mol Glucose. Auch bei einer Veränderung des pH-Wertes zeigte die *dcuD* Mutante keine signifikanten Unterschiede zu *dcuD*<sup>+</sup> Stämmen (nicht gezeigt).

Tab. 4: Bildung von Fermentationsprodukten bei anaerobem Wachstum mit Glucose. Die Zucht erfolgte in MOPS-Medium (pH 7,0) mit 20 mM Glucose. Die Proben wurden in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{578nm} = 0,7$ ) mit HPLC analysiert.

Stamm	Succinat	Acetat	Ethanol	Lactat	Formiat
		(mol / mol glucose)			
AN387 (Wildtyp)	0.23	0.70	1.00	0.23	1.80
IMW153 ( <i>dcuA dcuB dcuC</i> )	0.13	0.70	0.90	0.05	1.30
IMW209 ( <i>dcuA dcuB dcuC dcuD</i> )	0.19	0.80	1.20	0.30	2.20

Tab. 5: Einfluß des pH-Werts im Medium auf die Glucosefermentation von IMW244 (*dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*). Die Zucht erfolgte in MOPS-Medium mit 20 mM Glucose bis zu einer  $OD_{578nm}$  von 0,4.

pH - Wert	Succinat	Acetat	Ethanol (mol / mol glucose)	Lactat	Formiat	Pyruvat
6,0	0,05	0,33	0,56	0,17	0,77	0,10
7,0	0,04	0,36	0,68	0,04	1,10	0,12
8,0	0,06	0,35	0,66	0,03	1,10	0,12

Auf der Suche nach einer Beteiligung weiterer Effluxtransporter am Succinatexport wurde auch eine *citT* Mutante in Kombination mit *dcuC* untersucht. Über die gesamte Wachstumsphase von anaerob wachsenden Zellen wurde die Succinatkonzentration im Medium bestimmt (Abb. 10). Dabei zeigten sich zwischen Wildtyp und Mutante nur geringe Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der Succinatproduktion. Der Wildtyp beginnt mit der Ausscheidung von Succinat sogar etwas später als die Mutante. Der Anstieg der Succinatkonzentration ist bei Wildtyp und Mutante fast linear mit der Zeit. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es unwahrscheinlich, daß DcuD oder CitT den weiteren unbekanntem Succinateffluxcarrier darstellen.

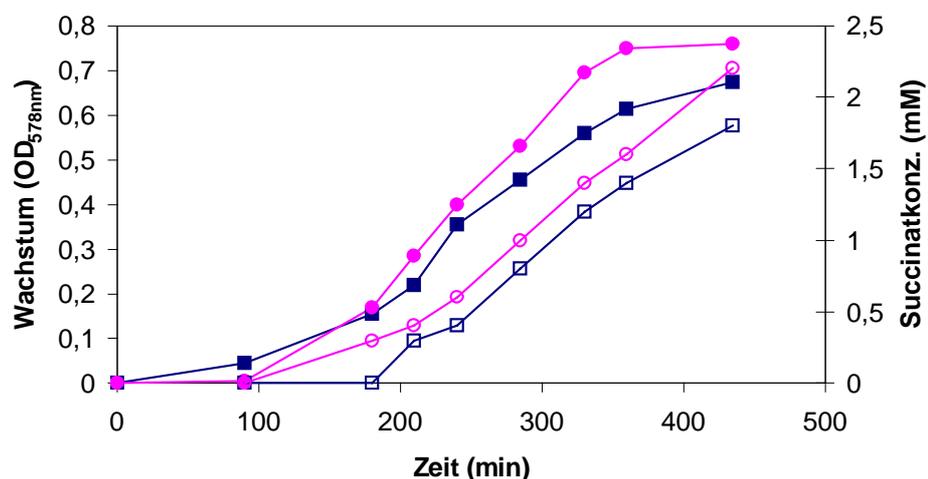


Abb. 10: Succinatproduktion aus Glucose bei anaerobem Wachstum von *E. coli* Wildtyp (AN387) und IMW277 (*dcuA dcuB dcuC citT*). Die Zellen wurden in MOPS-Medium (pH 7,0) mit 20 mM Glucose gezüchtet.

□, Succinatproduktion von AN387, ■, Wachstum von AN387

○, Succinatproduktion von IMW277, ●, Wachstum von IMW277

## Kinetik des Succinatexports in Suspensionen fermentierender Zellen

Wie gezeigt, kann die *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD* Fünffachmutante (IMW244) unter fermentierenden Bedingungen weiterhin Succinat ausscheiden. Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß die Dcu Carrier die einzigen essentiellen Succinateffluxcarrier darstellen. Zur genaueren Charakterisierung sollte die Kinetik des Succinateffluxes in Zellsuspensionen untersucht werden. Dazu wurden Zellsuspensionen mit hoher Zelldichte hergestellt und nach Zugabe von Glucose in kurzen Zeitintervallen der Gehalt an Succinat und Acetat im Medium bestimmt (Abb. 11).

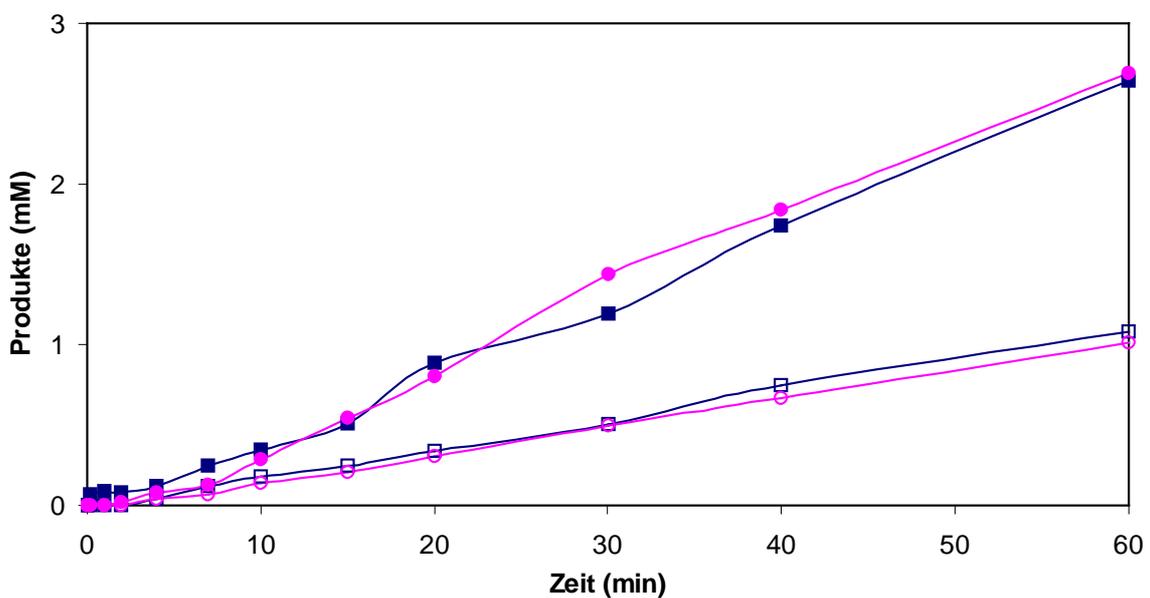


Abb. 11: Kinetik der Bildung von Succinat und Acetat in Zellsuspensionen von AN387 und IMW213b (*dctA dcuA dcuB dcuC*). Der Start erfolgte durch Zugabe von 10 mM Glucose unter anaeroben Bedingungen. Die Suspensionen ( $OD_{578nm} = 2,5$ ) wurden aus anaerob mit Glucose gezüchteten Zellen hergestellt.

□, Succinatproduktion von AN387, ■, Acetatbildung von AN387

○, Succinatproduktion von IMW277, ●, Acetatbildung von IMW277

Nach einer kurzen Verzögerungsphase, die im Wildtyp und der Mutante ähnlich war, schieden beide Stämme Succinat aus. Die Effluxrate von Succinat war in beiden Stämmen vergleichbar. Es wurde ca. 0.2 mol Succinat / mol Glucose gebildet. Acetat wurde etwa doppelt so schnell ausgeschieden, doch auch hier waren keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Fünffachmutante erkennbar. Aus der Kinetik läßt sich eine Effluxrate von 26  $\mu$ mol Succinat / min / g TG für Succinat berechnen, was wesentlich höher als eine mögliche Diffusion von Succinat ist, selbst wenn man sehr hohe interne Succinatkonzentrationen annimmt. Somit war auch in den Zell-

suspensionen die Effluxgeschwindigkeit im Wildtyp und der Fünffachmutante sehr ähnlich. Aus diesem Grund scheint neben DcuC (Zientz *et al.*, 1999) ein weiterer Succinateffluxcarrier vorzuliegen, der den Efflux in der Fermentation bewirkt. Bei diesem zusätzlichen Carrier kann es sich aber (wie hier gezeigt) nicht um DcuD oder CitT handeln.

### **DctA unabhängiger Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten im aeroben Wachstum**

Unter aeroben Bedingungen übernimmt DctA den größten Anteil am Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten (Davies *et al.*, 1999, Kay *et al.*, 1971). Die Aufnahme der C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren Fumarat, Succinat, Malat, der C<sub>4</sub>-Dicarboxylaminosäure Aspartat, sowie Orotat (Baker *et al.*, 1996) wird durch DctA katalysiert. Eine *dctA* Mutante kann auf den genannten Substraten nur noch sehr langsam wachsen. DcuA kann in geringem Umfang zum aeroben Transport beitragen, denn *dcuA* wird aerob und anaerob konstitutiv exprimiert (Golby *et al.*, 1998), besitzt aber nur geringere Aktivität (Zientz *et al.*, 1999, Janausch *et al.*, 2001). Die Expression von *dctA* erfolgt besonders in der spätlogarithmischen Wachstumsphase und wird durch Dicarbonsäuren induziert. Weitere aerobe C<sub>4</sub>-Dicarboxylattransporter sind bei *E. coli* nicht bekannt. Die Beteiligung eines bindeproteinabhängigen Systems am Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten konnte kürzlich ausgeschlossen werden (Davies *et al.*, 1999).

### **Wachstumsverhalten von DctA Mutanten**

Der Wildtyp (AN387) ist in der Lage, aerob C<sub>4</sub>-Dicarboxylate als einzige Kohlenstoff und Energiequelle zu nutzen. Dies ist sowohl bei saurem, als auch bei neutralem pH möglich. Bei pH 6 wird allerdings eine deutlich höhere Zelldichte erreicht und zwar unabhängig von der C-Quelle (Abb. 12). Die *dctA* Mutante konnte unter aeroben Bedingungen bei pH 7 wie erwartet nicht mehr mit C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten wachsen. Durch Senken des pH-Wertes auf pH 6 konnte das Wachstum mit Succinat wiederhergestellt werden (Abb. 12a). Die Wachstumskurven des Wildtyps (AN387) und der Fünffachmutante IMW244 (*dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*) mit Succinat unterschieden sich bei pH 6 kaum. Die Mutante hatte eine längere lag-Phase, die maximale Wachstumsrate war ähnlich wie für den Wildtyp. Bei pH 7 zeigte die Mutante jedoch

nur noch sehr geringes Wachstum. Mit Fumarat als Substrat wuchs die Mutante jedoch weder bei pH 6 noch bei pH 7 (Abb. 12b).

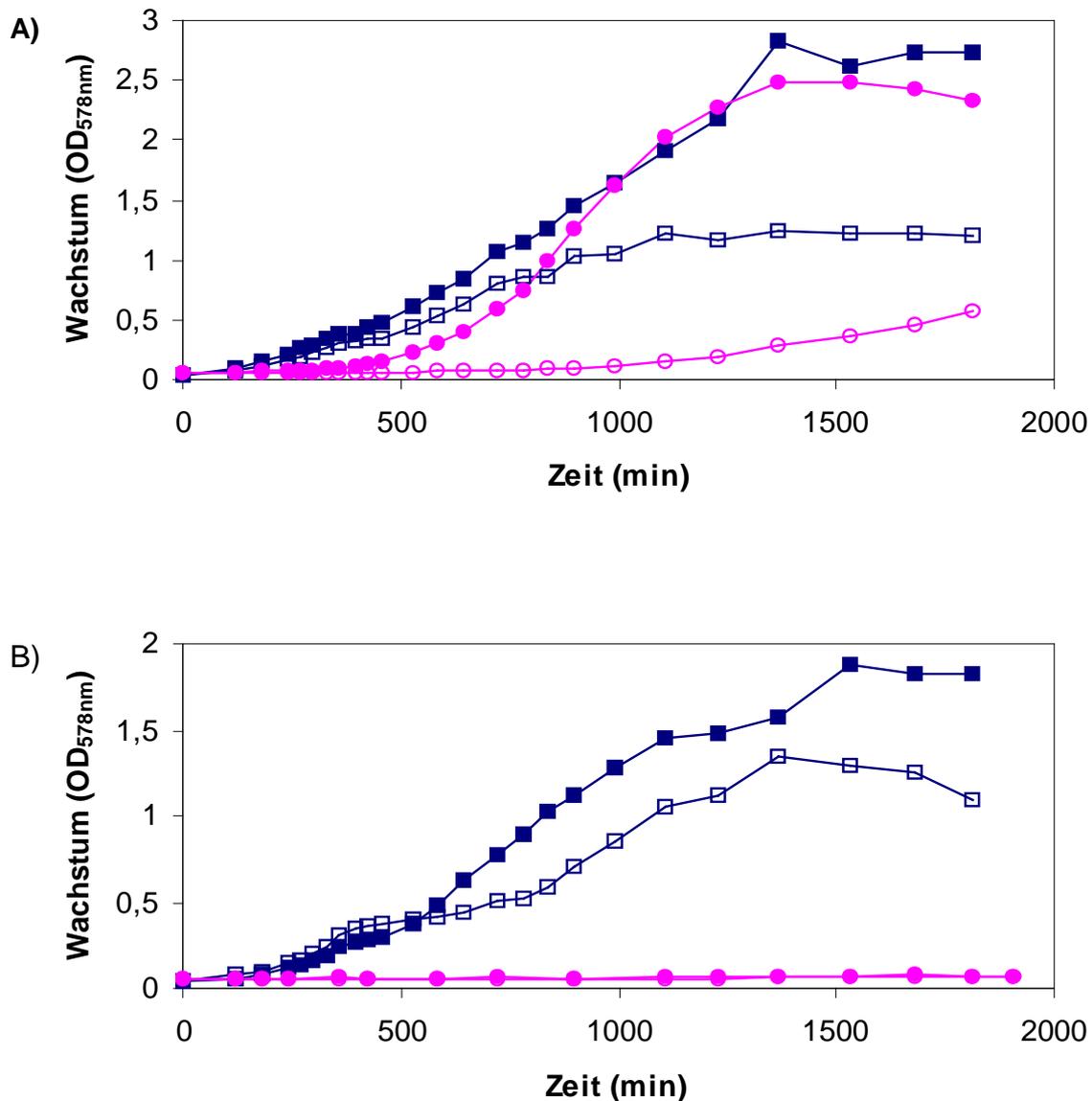


Abb. 12: Aerobes Wachstum von *E. coli* AN387 (Wildtyp) und IMW244 (*dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*) mit 20 mM Succinat (A) oder Fumarat (B). Die Zucht erfolgte in M9-Medium bei pH 6 (offene Symbole) und pH 7 (geschlossene Symbole).

■, AN387 pH 6, □, AN387 pH 7, ●, IMW244 pH 6, ○, IMW244 pH 7

### Succinat- und Fumarataufnahme in Zellsuspensionen der *dctA* Mutante

Zur genauen Untersuchung des C<sub>4</sub>-Dicarboxylattransports in der *dctA* Mutante wurden Transportmessungen mit Zellsuspensionen von Wildtyp und Mutante durchgeführt. Dazu wurden die Zellen bei pH 6 mit Succinat gezüchtet und Zellsuspensionen (pH 6) hergestellt. Die Zellen wurden mit Lactat energetisiert. Die

Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat stieg während der ersten Minute proportional zur Zeit an und erreichte dann einen konstanten Gehalt in der Zelle (Abb. 13). Bei weiteren Experimenten wurde die Aufnahme immer nach einer Minute bestimmt und daraus die Aufnahmegeschwindigkeit berechnet.

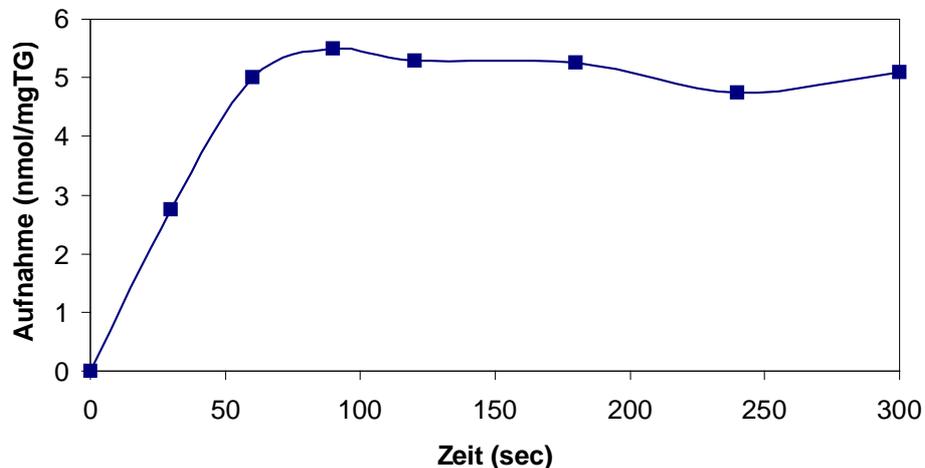


Abb.13: Kinetik der Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat (10  $\mu\text{M}$ ) durch Zellsuspensionen von *E. coli* AN387 (Wildtyp) bei pH 6. Die Zucht erfolgte in M9-Medium mit Succinat bei pH 6.

Für die Aufnahmegeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration findet man beim Wildtyp eine typische Michaelis-Menten Kinetik (Abb. 14a) mit einer maximalen Aufnahmegeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) von 35 U / mg Trockengewicht und einer Michaelis-Menten Konstante ( $K_m$ ) von 50  $\mu\text{M}$  für Succinat. Einen völlig anderen Verlauf zeigt die Kinetik der Mutante IMW244 (*dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*). Die Aufnahme folgte nicht einer Michaelis-Menten Kinetik. Mit steigender Substratkonzentration stieg die Aufnahmegeschwindigkeit fast linear an. Selbst bei hohen Substratkonzentrationen wurde der Transport nicht gesättigt, und  $V_{max}$  und  $K_m$  konnten nicht bestimmt werden. Bei geringen Substratkonzentrationen zeigte die Mutante wesentlich niedrigere Transportraten als der Wildtyp, doch bei hohen Konzentrationen (ab 2 mM) waren sie vergleichbar hoch. Mit Fumarat waren die Aufnahmegeschwindigkeiten im Wildtyp zwar geringer als mit Succinat, zeigten aber wieder eine typische Michaelis-Menten Kinetik (Abb. 14b). Die Mutante hingegen besaß nur äußerst geringe Aufnahmeaktivitäten für Fumarat, und die Aktivität war gegenüber dem Wildtyp etwa 100-fach erniedrigt.

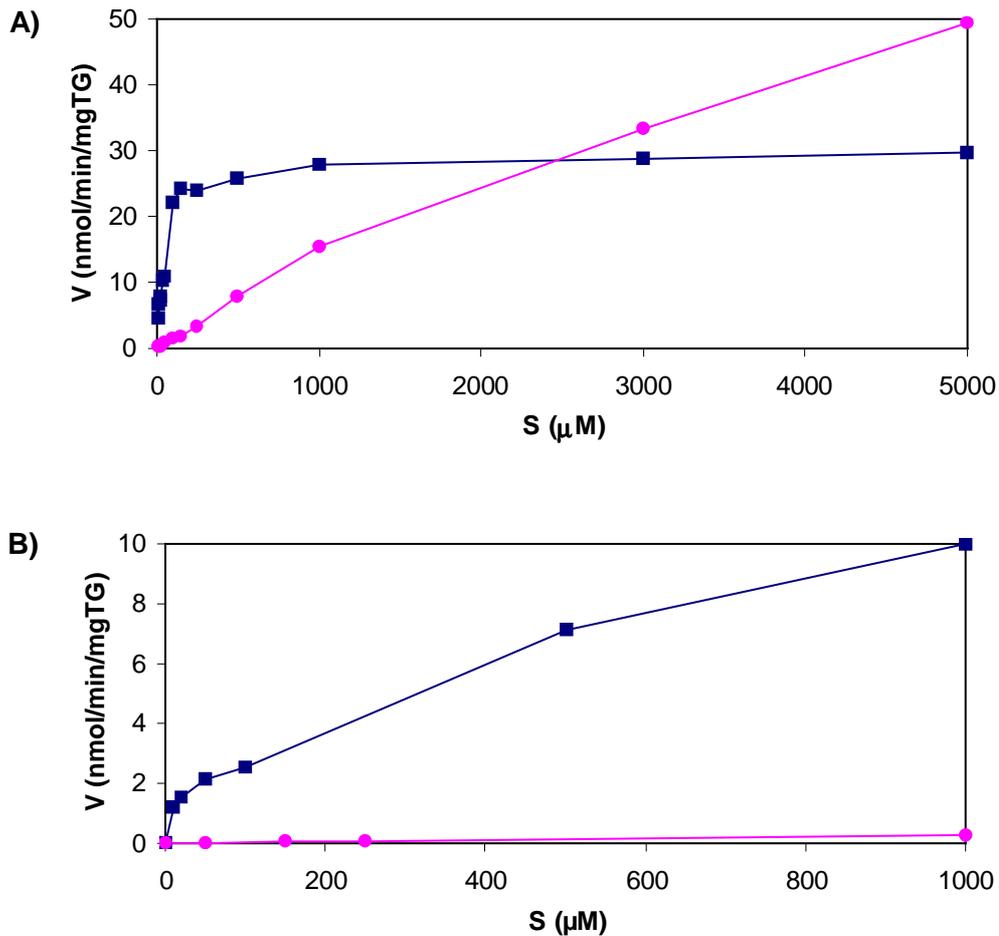


Abb. 14: Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat (A) und [ $^{14}\text{C}$ ]-Fumarat (B) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration durch Zellsuspensionen von *E. coli* AN387 (Wildtyp) und IMW244 (*dctA dctB dctC dctD*). Die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat oder [ $^{14}\text{C}$ ]-Fumarat wurde nach einer Inkubationszeit von 1 min und bei einem pH-Wert von 6 gemessen.

■, AN387, ●, IMW244

### pH-Abhängigkeit der Succinataufnahme

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Geschwindigkeit der Succinataufnahme für die Fünffachmutante (IMW244) ist in Abb. 15 dargestellt. Hierbei zeigte die Mutante deutlich höhere Aufnahmeraten bei saurem pH-Wert, als bei neutralem oder basischem pH-Wert. Unabhängig vom pH-Wert stieg die Aufnahmegeschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration fast linear an.

Da für die Mutante kein  $V_{max}$  angegeben werden kann, wurden die Transportraten von Wildtyp und Mutante für zwei verschiedene Substratkonzentrationen verglichen (Abb. 16). Die Transportgeschwindigkeiten der Mutante nehmen von pH 8 bis pH 5 stetig zu. Der Wildtyp hingegen hat ein klares Maximum der Transportaktivität bei pH

6, und bei pH 5 oder pH 8 ist diese um ca. 50 % reduziert. Die Transportaktivität spricht damit in gleicher Weise auf den pH-Wert an wie die Wachstumsgeschwindigkeit. Der Wildtyp wächst bei pH 6 auf Succinat schneller und zu höheren OD-Werten als bei pH 7 und hat bei diesem pH-Wert auch die höchsten Transportgeschwindigkeiten.

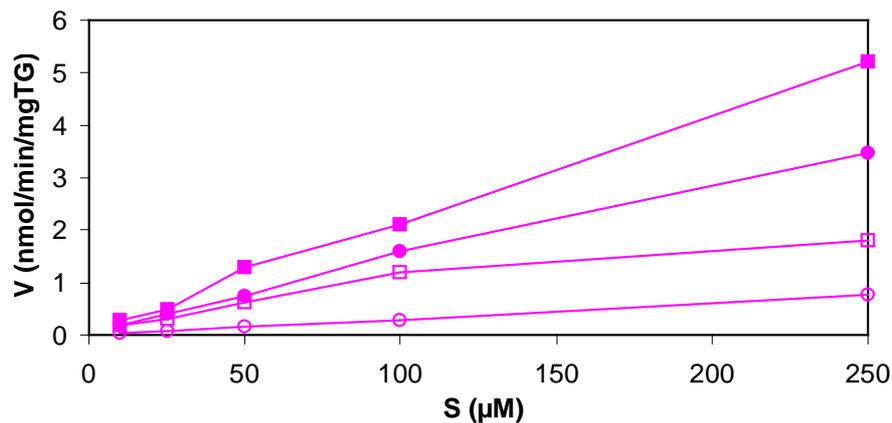


Abb. 15: Aufnahme von  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat durch Zellsuspensionen von IMW244 (*dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Bakterien wurden in M9-Medium mit Succinat bei pH 6 gezüchtet.

■, pH 5, ●, pH 6, □, pH 7, ○, pH 8

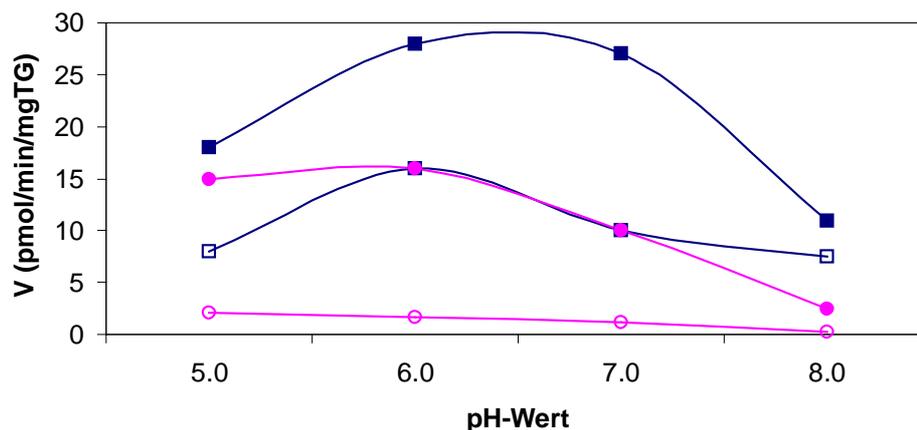


Abb. 16: Vergleich der Transportaktivitäten von AN387 und IMW244 (*dctA dcuABCD*) für die Aufnahme von  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat bei pH-Werten von 5 - 8 und zwei verschiedenen Substratkonzentrationen. Die Werte sind in nmol / min / mg TG angegeben.

□, AN387 0,1 mM Succinat, ■, AN387 1 mM Succinat

○, IMW244 0,1 mM Succinat, ●, IMW244 1 mM Succinat

## Einfluß von Entkoppler auf den Succinattransport

Der Einfluß von Entkoppler auf die Succinataufnahme wurde untersucht. Der Wildtyp zeigte eine fast vollständige Hemmung der Succinataufnahme bei Zusatz des Entkopplers SF6847 (Tab. 6). Dies ist im Einklang mit früheren Beobachtungen, daß für die Succinataufnahme ein  $H^+$ -Potential über der Membran benötigt wird (Gutowski *et al.*, 1975). Die Mutante unterschied sich durch geringere Transportaktivität vom Wildtyp, wurde aber ebenfalls durch Entkoppler gehemmt (94 %). Damit scheint auch in der Mutante ein Carrier zu arbeiten, der durch ein  $H^+$ -Potential getrieben wird.

Tab. 6: Einfluß des Entkopplers SF6847 (Terada, 1981) (10  $\mu$ M) auf die Aufnahme von Succinat bei AN387 und IMW244 (*dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*). Die Aufnahme wurde mit 100  $\mu$ M [ $^{14}$ C]-Succinat bei pH 6 bestimmt.

Stamm	Succinataufnahme		
	<u>ohne Zusatz</u>	<u>mit 10 <math>\mu</math>M SF6847</u>	
	U / g	U / g	Hemmung in %
AN387	8,7	0,6	93
IMW244	1,6	0,1	94

## Einfluß der C-Quelle auf die Transportaktivitäten

Die Bakterien wurden aerob mit Succinat oder Glucose gezüchtet, und der Succinattransport wurde in Zellsuspensionen der Bakterien gemessen (Abb. 17). Sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante war die Aufnahmeaktivität nach Zucht mit Succinat zwei- bis dreifach erhöht. Während im Wildtyp nach Zucht auf Succinat die Aufnahme auch in Gegenwart hoher Succinatkonzentrationen konstant blieb, stieg sie in glucosegezüchteten Zellen bei hohen Succinatkonzentrationen (> 2,5 mM) weiter an. Der Anstieg verläuft dabei ähnlich wie in der Mutante. Möglicherweise handelt es sich in beiden Fällen um einen unspezifischen Carrier. Der Succinattransport bei Wildtyp und Mutante wird also durch Glucose reprimiert bzw. durch Succinat induziert. Die Glucoserepression bzw. Succinatinduktion, die für DctA bekannt ist (Davies *et al.*, 1999), wird also in ähnlicher Form für den unbekanntes Succinatcarrier in der Mutante gefunden.

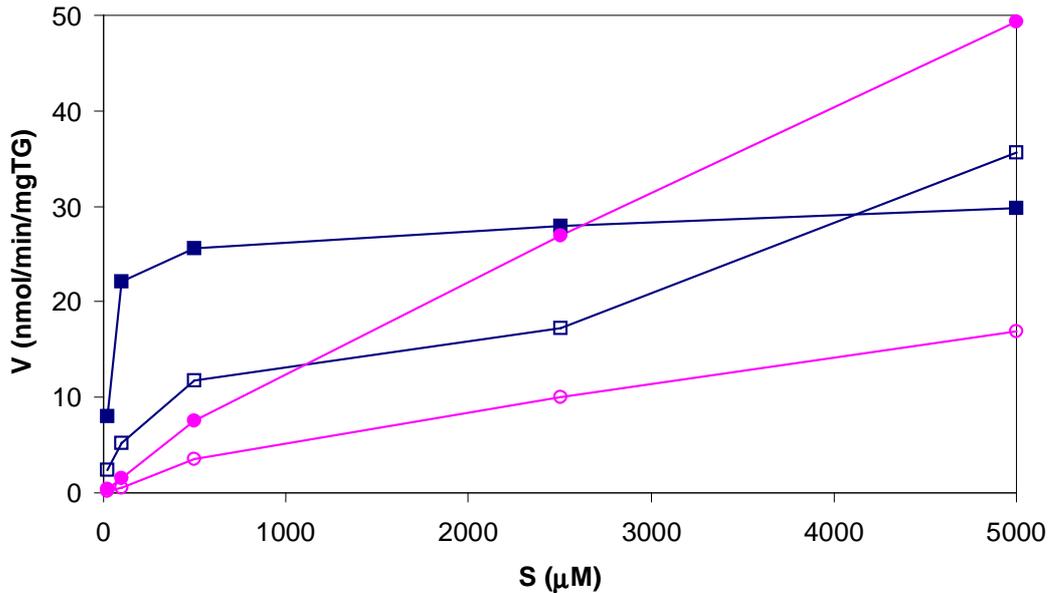


Abb. 17: Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat (100  $\mu\text{M}$ ) durch Zellsuspensionen von AN387 (Wildtyp) und IMW244 (*dctA dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*) nach Zucht in M9-Medium mit 20 mM Succinat oder Glucose bei pH 6.

■, AN387 Succinat, □, AN387 Glucose, ●, IMW244 Succinat, ○, IMW244 Glucose

### Untersuchungen zur Substratspezifität

Um das alternative Transportsystem näher zu charakterisieren wurde die Substratspezifität untersucht. Dabei wurde die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat in Anwesenheit von unmarkierten Kompetitorsubstraten gemessen, die in zehnfachem Überschuß zugesetzt wurden (Abb. 18). Beim Wildtyp wurde die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat besonders durch Succinat, Fumarat, Malat oder Aspartat gehemmt. Dies sind die typischen Substrate für DctA. Mono- oder Tricarboxylate, die keine Substrate von DctA darstellen, zeigten nur geringe oder gar keine Beeinflussung der Succinat-aufnahme. Anders sind die Verhältnisse in der Fünffachmutante. Hier wurde die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat besonders durch Monocarboxylate und Succinat gehemmt. Andere Dicarbonsäuren und Citrat zeigten keine Hemmwirkung mit Ausnahme von Maleinat, dem cis-Isomer von Fumarat. Die Hemmung der Succinat-aufnahme durch die Monocarboxylate Butyrat, Acetat und Propionat, könnte darauf hindeuten, daß in der Mutante Succinat durch einen Monocarboxylattransporter aufgenommen wird. In Übereinstimmung mit dieser Annahme erfolgt die Succinat-aufnahme in der Mutante am Effektivsten bei niedrigem pH-Wert ( $\text{pH} \leq 6$ ), wenn Succinat als Monoanion vorliegt (Abb. 15 und 16).

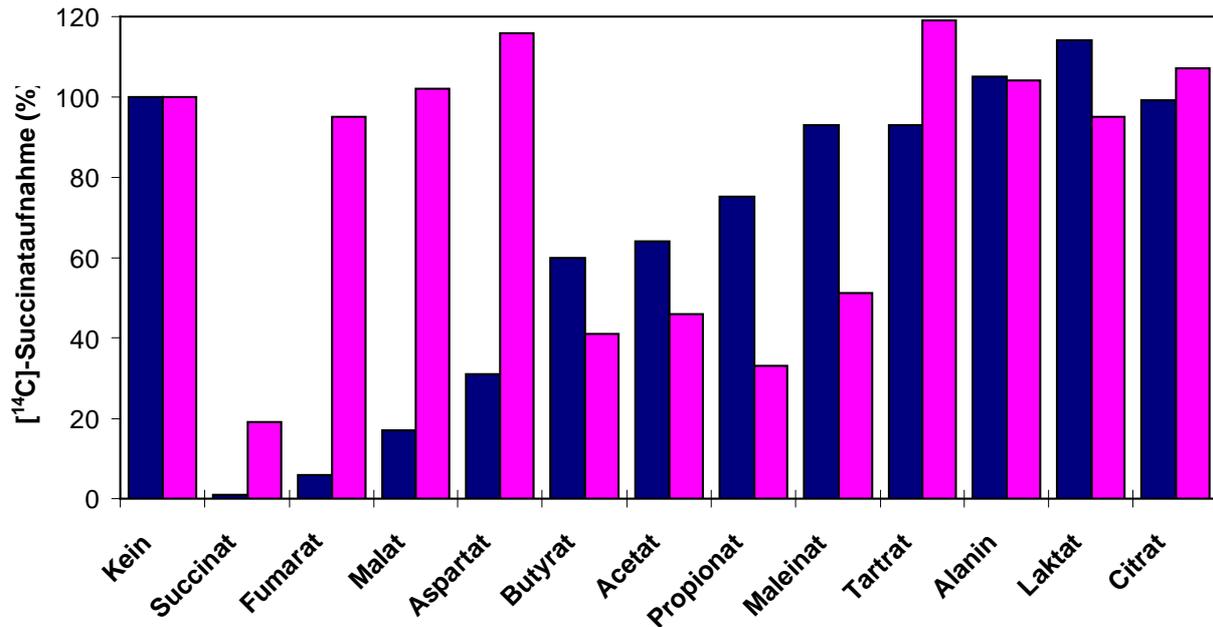


Abb. 18: Einfluß von unmarkierten Kompetitorsubstraten auf die Aufnahme von  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat durch *E. coli* AN387 (Wildtyp) (blau) und IMW244 (*dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*) (rosa) bei pH 6. Es sind die relativen Aufnahmeaktivitäten für  $[^{14}\text{C}]$ -Succinat (1 mM) angegeben. Die Aufnahmeraten ohne Kompetitorsubstrat für AN387 (22 U / g) und IMW244 (5 U / g) wurden jeweils 100 % gesetzt.

### Diffusion von $\text{C}_4$ -Dicarboxylaten durch Phospholipidmembranen

Die Diffusion von Succinat durch Phospholipidmembranen wurde bestimmt, um den Anteil der Diffusion am Transport des Succinats durch die Membran abzuschätzen. Dies sollte insbesondere für die Fünffachmutante zeigen, wieweit passive Diffusion zum Transport beiträgt, da frühere Berichte eine schnelle Diffusion von Succinat bei saurem pH durch die Membran vermuten ließen (Kaim *et al.*, 1998, 1999). Es wurden Liposomen aus Sojabohnen-Phospholipid und aus einem Phospholipidgemisch aus *E. coli* bei pH 8 hergestellt. Das *E. coli*-Phospholipidgemisch besteht hauptsächlich aus Phosphatidylethanolamin, während Phospholipid aus Sojabohnen vorwiegend Phosphatidylcholin enthalten.

Für die Aufnahmemessungen wurden die Liposomen (pH 8) in Puffer von pH 6 mit Succinat verdünnt, so daß ein pH-Gradient entstand. Diese Präparation stellt eine „Ionenfalle“ dar. Bei einem pH 6 im Medium sollte Succinat zum Teil als Monoanion und damit in einer Form vorliegen, die diffundieren kann. Gelangt das Monoanion in das Innere der Liposomen (pH 8), wird es zum Dianion und kann nicht mehr aus den Liposomen herausdiffundieren. Die Aufnahme von Succinat oder Fumarat wurde

nach Verdünnung der Liposomen in Puffer mit den Substraten bei pH 6 für eine Minute bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen (Abb. 19a). Zum Vergleich wurde auch die Aufnahme von gut diffundierenden (Phenylalanin) und schlecht diffundierenden (ATP) Substraten gemessen.

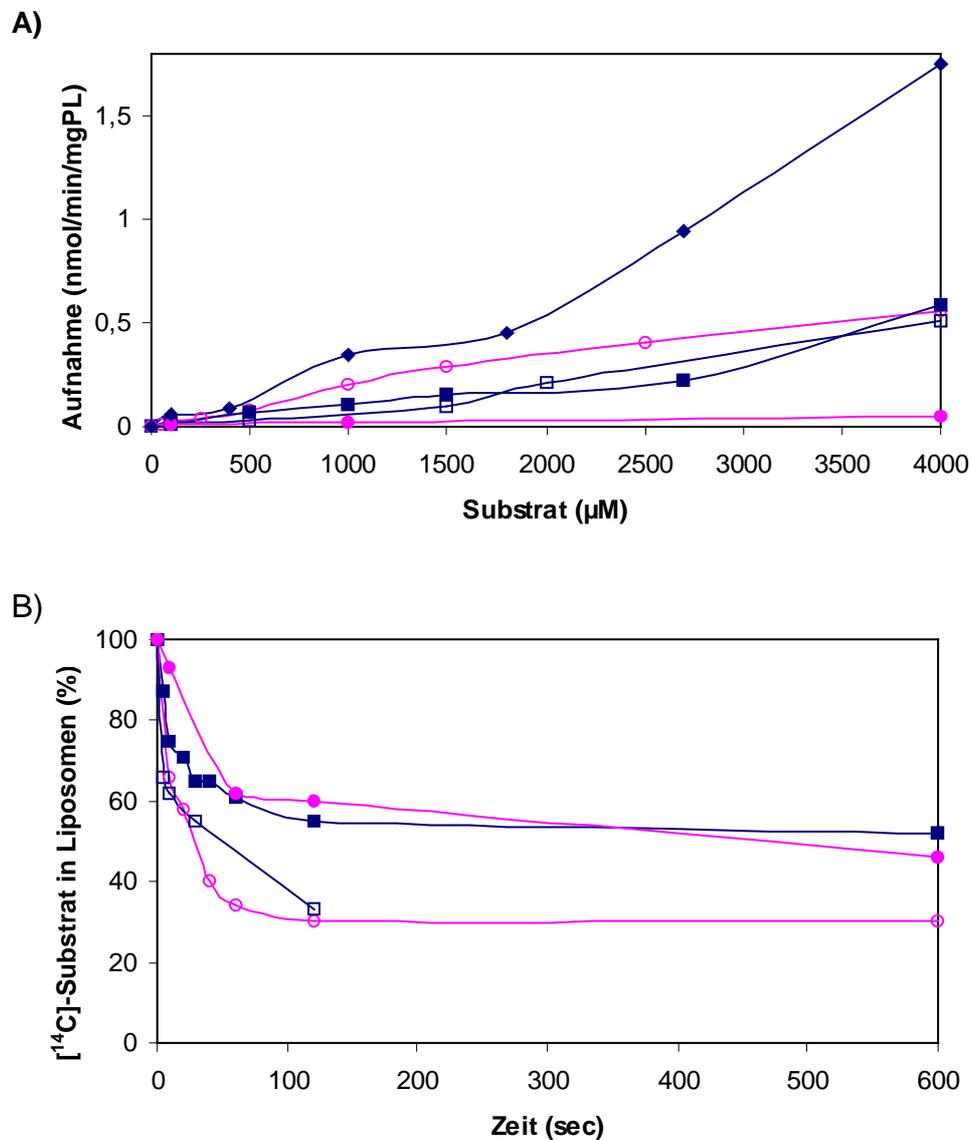


Abb. 19: Diffusion verschiedener Substrate durch Phospholipidmembranen. Die Aufnahme (A) wurde in Liposomen aus *E. coli*- oder Sojabohnen-Phospholipiden nach Inkubation mit dem Substrat (1 min) gemessen. Der pH-Wert der Liposomen war 8 (innen) bzw. 6 (Medium).

Liposomen aus *E. coli*-Phospholipiden: ■, Succinat, □, Fumarat, ◆, Phenylalanin

Liposomen aus Sojabohnen-Phospholipiden: ●, ATP, ○, Glycerin

Der Efflux (B) wurde durch Verdünnen (100 fach) von substratgeladenen Liposomen bestimmt. Hier war der pH-Wert 5 (innen) und 8 (Medium).

Liposomen aus *E. coli*-Phospholipiden: ■, Succinat, □, Phenylalanin

Liposomen aus Sojabohnen-Phospholipiden: ●, Succinat, ○, Glycerin

Mit zunehmender Substratkonzentration nahm die Aufnahmegeschwindigkeit der Substrate in linearer Weise zu. Selbst bei hohen Substratkonzentrationen (4 mM) trat keine Sättigung ein. Die Aufnahme zeigte damit die typischen Eigenschaften einer carrierunabhängigen Diffusion. ATP wurde kaum in die Liposomen aufgenommen, Phenylalanin hingegen konnte recht gut diffundieren. Die Aufnahme von Succinat und Fumarat war mit der von Glycerin vergleichbar. Die Aufnahme in Liposomen aus *E. coli* Phospholipidgemisch unterschieden sich nicht von der Aufnahme in Liposomen aus Sojabohnen-Phospholipid (nicht gezeigt).

Die Diffusion von Succinat und Fumarat ist also möglich, beträgt aber nur 0,1 U / mg Phospholipid. In Bakterien machen die Phospholipide nur ca. 10 % des Trockengewichts aus. Die Transportaktivität für Succinat beträgt deshalb im Wildtyp bei einer Succinatkonzentration von 1 mM 26 U / mg TG bzw. 260 U / mg Phospholipid und in der Fünffachmutante 16 U / mg TG bzw. 160 U / mg Phospholipid. Diese Aktivitäten sind damit 2600 bzw. 1600 mal höher als die passive Diffusion von Fumarat oder Succinat durch die Membran (Tab. 7). Die Diffusion spielt deshalb beim Transport von Succinat und Fumarat nur eine sehr untergeordnete Rolle. Dies läßt den Schluß zu, daß auch in der Fünffachmutante ein weiteres aktives Transportsystem nötig ist, und passive Diffusion allein die hohen Transportaktivitäten für Succinat nicht erklären kann.

Tab. 7: Transport von Succinat und Fumarat durch *E. coli* Wildtyp (AN387) und die Fünffachmutante IMW244 (*dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*) und in Liposomen aus *E. coli*-Phospholipidgemisch. Die Bakterien wurden aerob mit 20 mM Succinat bei pH 6 gezüchtet. Die Aufnahmemessung wurde mit gewaschenen Bakterien oder Liposomen in Phosphatpuffer (pH 6) mit 1 mM [<sup>14</sup>C]-Succinat oder [<sup>14</sup>C]-Fumarat durchgeführt. Für die Effluxmessungen erfolgte die Zucht der Bakterien anaerob mit 20 mM Glucose. Der Efflux wurde abgeleitet aus der Menge an ausgeschiedenem Succinat (vergl. Abb. 11).

Stamm oder Liposomen	Substrat	Aufnahme (U / g TG)	Efflux (U / g TG)
Liposomen	Succinat	0,02	n.d.
	Fumarat	0,01	n.d.
AN387 (Wildtyp)	Succinat	28	26
	Fumarat	10	n.d.
IMW244 ( <i>dctA dcuA dcuB dcuC dcuD</i> )	Succinat	16	26
	Fumarat	0,25	n.d.

n.d. nicht durchgeführt

Der Efflux der Substrate aus Liposomen wurde ebenfalls bestimmt. Dabei wurden die Liposomen in Gegenwart von radioaktiv markiertem Substrat bei einem pH-Wert von 5 hergestellt. Nach 100facher Verdünnung in substratfreiem Puffer von pH 8 wurde die Kinetik des Substratefflux aufgenommen. Nach dem Verdünnen wurden Proben entnommen, schnell filtriert und gewaschen. Damit wurde die Menge an Substrat bestimmt, die sich noch in den Liposomen befand. Es zeigte sich eine rasche Abnahme der internen Substratkonzentration bis zu einem konstanten Wert, der bereits nach 1 bis 2 Minuten erreicht wurde (Abb. 19b). Möglicherweise verhindert die Bildung eines Membranpotentials beim Efflux der Monoanionen eine weitere Diffusion aus den Liposomen. Auch bei den Effluxexperimenten zeigten sich keine Unterschiede zwischen Liposomen aus *E. coli*-Phospholipidgemisch und Sojabohnen-Phospholipid. Glycerin und Phenylalanin diffundierten wesentlich schneller als Succinat aus den Liposomen. Innerhalb von 1 min waren ca. 70 % des Glycerins aus den Liposomen diffundiert, aber weniger als 40 % des Succinats.

## II. Charakterisierung des Fumaratsensors DcuS

Unter anaeroben Bedingungen kann *E. coli* Fumarat in der Fumaratatmung als Elektronenakzeptor nutzen. Für die Fumaratatmung wird die Fumaratreduktase (*frdABCD* Operon) und der Fumarat / Succinat Antiporter DcuB benötigt. Die Fumaratreduktase und der Dicarboxylatcarrier DcuB werden nur unter anaeroben Bedingungen und in Anwesenheit von Substrat gebildet. Die Regulation durch Sauerstoff erfolgt über den globalen Regulator FNR. Die fumaratabhängige Induktion wird durch das Zweikomponentensystem DcuSR kontrolliert (Zientz *et al.*, 1998). In Anwesenheit von Fumarat wird die Expression des *frd* Operons um den Faktor 2 induziert, die Expression von *dcuB* hängt fast vollständig von DcuSR und der Anwesenheit von Fumarat oder anderen C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten (Succinat, Malat, Maleinat, Aspartat, Tartrat) ab.

Nach der Identifizierung dieses Regulationssystems sollte die Funktion des Sensors DcuS genauer untersucht werden. Zum Verständnis der Arbeitsweise von DcuS waren Informationen über die Struktur nötig. Erste Ansätze zur Strukturaufklärung wurden mit der periplasmatischen Domäne von DcuS durchgeführt (Zientz, 2000). Zu diesem Zweck wurde diese Domäne als lösliches Protein überproduziert und die Struktur mit NMR-Spektroskopie untersucht (Parac *et al.*, 2000). Die Sekundärstruktur war bereits teilweise bekannt, die dreidimensionale Struktur und die Substratbindestelle konnten noch nicht identifiziert werden.

In der Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze zur Funktionsanalyse von DcuSR verfolgt. Zum einen sollte die Struktur der periplasmatischen Domäne weiter aufgeklärt und die Fumaratbindestelle identifiziert werden. Die Bindestelle sollte dabei *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Zur Strukturaufklärung wurden zunächst die NMR-spektroskopischen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit der AG Griesinger fortgeführt. Zweitens sollte die Funktion des Zweikomponentensystems DcuSR unter definierten Bedingungen und ohne Einfluß weiterer Proteine *in vitro* analysiert werden. Dazu sollte DcuS isoliert und in Liposomen rekonstituiert werden. In den Proteoliposomen sollte dann die Phosphorylierung von DcuS und die Übertragung des Phosphatrestes auf DcuR nachgewiesen werden.

## Strukturuntersuchung der periplasmatischen Domäne von DcuS durch NMR-Spektroskopie

### Struktur der periplasmatischen Domäne

Für die NMR Untersuchungen wurde die periplasmatische Domäne von DcuS als lösliches Protein isoliert (Zientz, 2000). Die isolierte periplasmatische Domäne umfaßte die Aminosäuren 45 bis 180 (DcuS<sub>45-180</sub>) und entspricht dem vollständigen Bereich zwischen den beiden Transmembranhelices. Das Gen *dcuS* war mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-tag versehen und hinter den induzierbaren T7 Promotor des Expressionsplasmids pMW145 kloniert worden (Zientz, 2000). Die Synthese von DcuS<sub>45-180</sub> wurde durch Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach Induktion der Expression enthielt die lösliche Zellfraktion eine Bande mit der erwarteten Größe von ca. 15 kDa (Abb. 20).

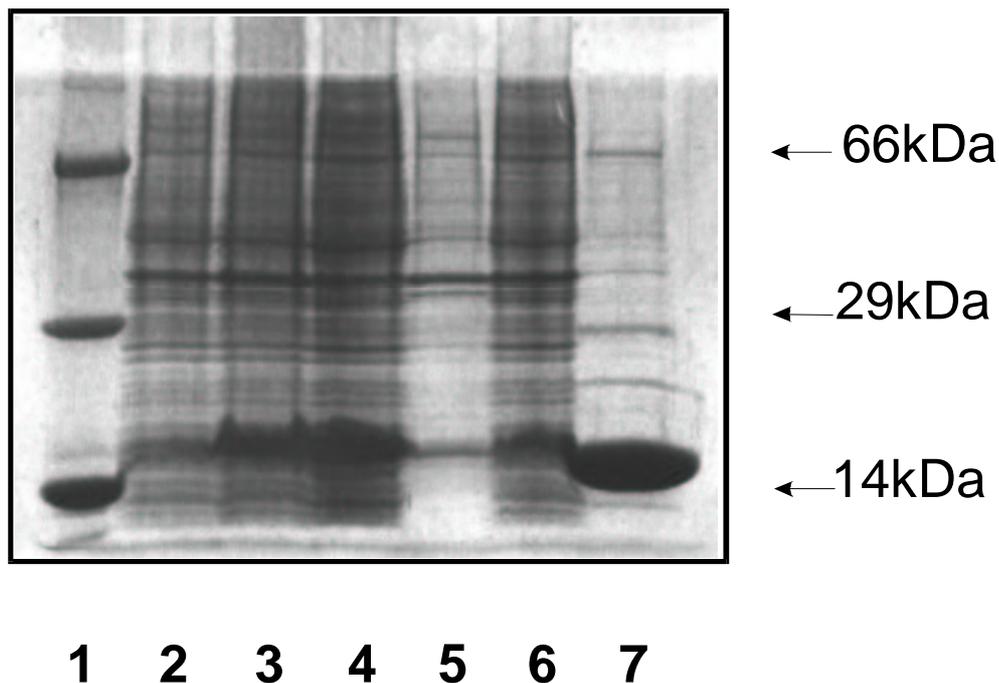


Abb. 20: Überproduktion und Reinigung von DcuS<sub>45-189</sub>-His<sub>6</sub> aus *Escherichia coli* BL21DE3 (pMW145). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und nach Coomassie gefärbt. (mit freundlicher Genehmigung von E. Zientz)

Spur:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1: Standard: BSA (M <sub>r</sub> 60.000), Carboanhydrase (M <sub>r</sub> 30.000) und Lysozym (M <sub>r</sub> 14.000) |               |
| 2: Zellhomogenat vor der Induktion   | 10 µg Protein |
| 3: Zellhomogenat nach 3 Std. Induktion mit IPTG  | 20 µg Protein |
| 4: Lösliche Fraktion vor der Ni-NTA-Agarose-Säule  | 20 µg Protein |
| 5: Membranfraktion   | 5 µg Protein  |
| 6: Durchlauf der Ni-NTA-Agarose-Säule  | 20 µg Protein |
| 7: Isolierte periplasmatische Domäne DcuS <sub>45-189</sub> -His <sub>6</sub>  | 20 µg Protein |

Die lösliche Fraktion des Zellhomogenats wurde durch eine Ni<sup>2+</sup>-Chelat-Säule gepumpt. Das Fusionsprotein band an die Säule, während die meisten anderen Proteine die Säule passierten. Das Fusionsprotein wurde mit Imidazol eluiert. Das Imidazol wurde nach der Elution durch Dialyse entfernt und die Proteinkonzentration der Lösung wurde durch Ultrafiltration auf 15 - 25 mg / ml erhöht, ohne daß das Protein aggregierte. Das Protein wurde bei -80°C gelagert und war unter diesen Bedingungen mehrere Monate stabil. Aus einem Liter Kulturvolumen wurden ca. 20 mg Protein isoliert.

Die Struktur der periplasmatischen Domäne wurde durch NMR-Spektroskopie untersucht. Dazu wurden HSQC-Spektren (Heteronuclear Single Quantum Coherence) aufgenommen (Abb. 21a). Diese Spektren stellen eine Art Fingerabdruck des Proteins dar. Aus den Daten solcher Spektren kann man die Struktur des Proteins berechnen. In Abbildung 21b ist die berechnete Struktur der periplasmatischen Domäne von DcuS dargestellt. Die Sekundärstruktur konnte vollständig aufgeklärt werden. Die dreidimensionale Struktur ist noch nicht vollständig aufgeklärt, ein vorläufiges Modell kann aber schon entworfen werden (Abb. 21b). Am N-terminalen Ende der Domäne befanden sich zwei  $\alpha$ -Helices von Aminosäure 52 bis 63 und von Aminosäure 86 bis 89. Im zentralen Bereich lagen vier  $\beta$ -Faltblätter, die aus den Aminosäuren 99 bis 101, 134 bis 138, 145 bis 152 und 161 bis 167 bestanden. Zwischen den  $\beta$ -Faltblättern befanden sich längere Schleifen („U-turns“) und die Enden der  $\beta$ -Faltblätter lagen in räumlicher Nähe zum Anfang des folgenden  $\beta$ -Faltblattes. Dadurch ergibt sich eine antiparallele Orientierung der Faltblätter zueinander. Die 4  $\beta$ -Faltblätter lagen zudem in einer Ebene. Zwischen den Faltblättern  $\beta_1$  und  $\beta_2$  befand sich eine weitere  $\alpha$ -Helix (Aminosäuren 127 bis 130). Am C-terminalen Ende befand sich eine  $\alpha$ -Helix, die aus den Aminosäuren 173 bis 176 aufgebaut war. Die Bindedomäne besteht also aus 4  $\beta$ -Faltblättern und 4  $\alpha$ -Helices in der Reihenfolge  $\alpha_2\beta_1\alpha_1\beta_3\alpha_1$ .

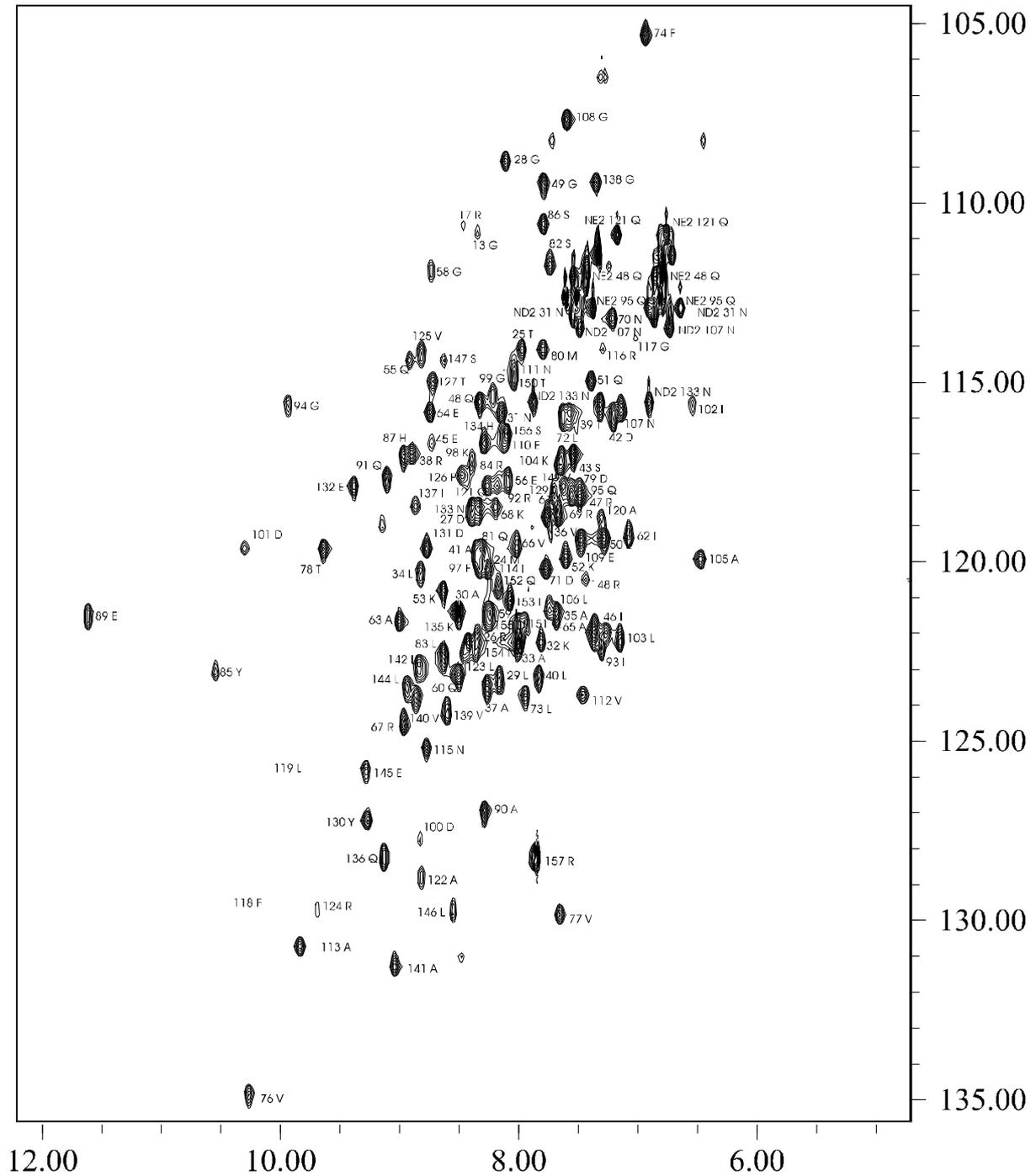


Abb. 21a: HSQC Spektrum der periplasmatischen Domäne von DcuS. Den Gipfel konnten die entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf das isolierte Protein mit His-tag. Die X-Achse zeigt die  $^1\text{H}$ -Frequenz und die Y-Achse die  $^{15}\text{N}$ -Frequenz.

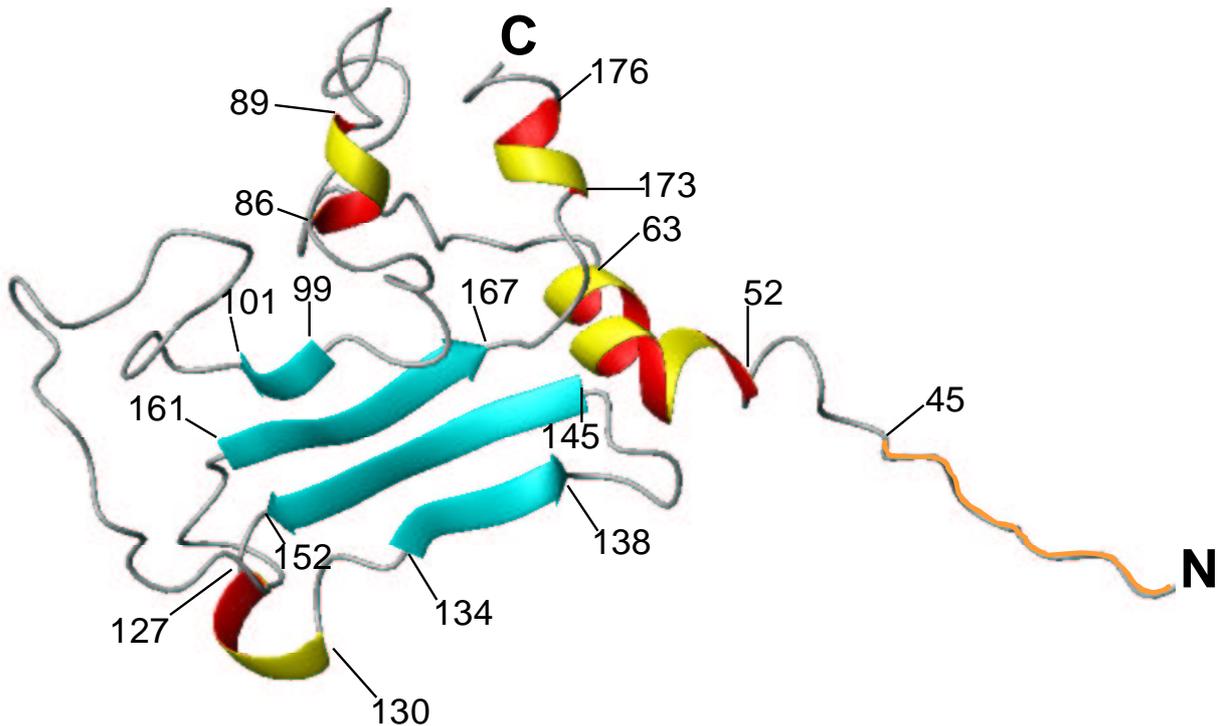


Abb. 21b: Vorläufige Struktur der periplasmatischen Domäne von DcuS. Das Modell wurde aus den Daten der NMR-Spektroskopie abgeleitet.  $\alpha$ -helikale Bereiche sind schraubenförmig (gelb-rot) dargestellt und  $\beta$ -Faltblätter sind durch Pfeile (türkis) angedeutet. Die Positionen der Sekundärstrukturen sind angegeben und beziehen sich auf das Gesamtprotein. Der N-terminale His-tag ist orange eingefärbt. Die Tertiärstruktur ist noch vorläufig.

## Identifizierung der Fumaratbindestelle

### Effektorbindung an DcuS in vivo und in vitro

Die Bindungsstelle für Fumarat sollte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht werden. Die Bindung eines Liganden an ein Protein kann kleine Strukturveränderungen im Bereich der Bindestelle verursachen. Diese lassen sich mit HSQC-Spektren (Heteronuclear Single Quantum Coherence) detektieren. Dabei wird das magnetische Moment von bestimmten Atomkernen (z.B.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) in einem äußeren Magnetfeld gemessen. Das magnetische Moment wird durch den Spinzustand des Kerns verursacht. Es gibt zwei mögliche Zustände, die sich durch geringfügige Energiedifferenz auszeichnen. Ein Übergang zwischen den Energiezuständen durch Absorption elektromagnetischer Strahlung führt zu einem spezifischen Signal im Spektrum. Diese Resonanzfrequenz ist abhängig von der Umgebung des betreffenden Kerns, die eine geringe Abschirmung des Magnetfeldes verursachen kann. Dies führt zu einer „chemischen Verschiebung“, d.h. einer Verschiebung der

Resonanzfrequenz aufgrund der chemischen Umgebung und liefert damit Hinweise auf die direkte Umgebung des Atomkerns (Wishart *et al.*, 1991, 1992).

Die Struktur der periplasmatischen Domäne von DcuS wurde mit und ohne Fumarat im Puffer analysiert. Die Aminosäuren Arginin 107, 139, 147 und Alanin 145 zeigten in Anwesenheit von Fumarat im HSQC-Spektrum eine veränderte Position. Die Verschiebungen im Spektrum sind ein guter Hinweis, daß die isolierte DcuS-Domäne Fumarat bindet und die genannten Aminosäuren eine Wechselwirkung mit dem gebundenen Fumarat eingehen. Für Arginin147 (R147) wurde diese Verschiebung mit unterschiedlichen Fumaratkonzentrationen bestimmt (Abb. 22a). Die Verschiebung wurde mit zunehmender Fumaratkonzentration größer und erreichte schließlich ein Maximum. Der Verlauf der Kurve entspricht einer Michaelis-Menten Kurve mit einem  $K_D$ -Wert von 1 mM für Fumarat.

Abb. 22b zeigt die Titration der Expression einer *dcuB*'-*lacZ* Fusion in vivo in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen des Effektors Maleinat. Die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität wurde in den Bakterien nach anaerober Zucht mit Glycerin und DMSO und variablen Konzentrationen Maleinat gemessen. Maleinat dient als unphysiologischer Effektor von DcuS, der nicht in die Zelle aufgenommen und verstoffwechselt wird. Mit Maleinat wurde ein  $K_D$ -Wert von 3 mM ermittelt. Dieser ist damit vergleichbar mit dem  $K_D$ -Wert der isolierten Bindedomäne für Fumarat.

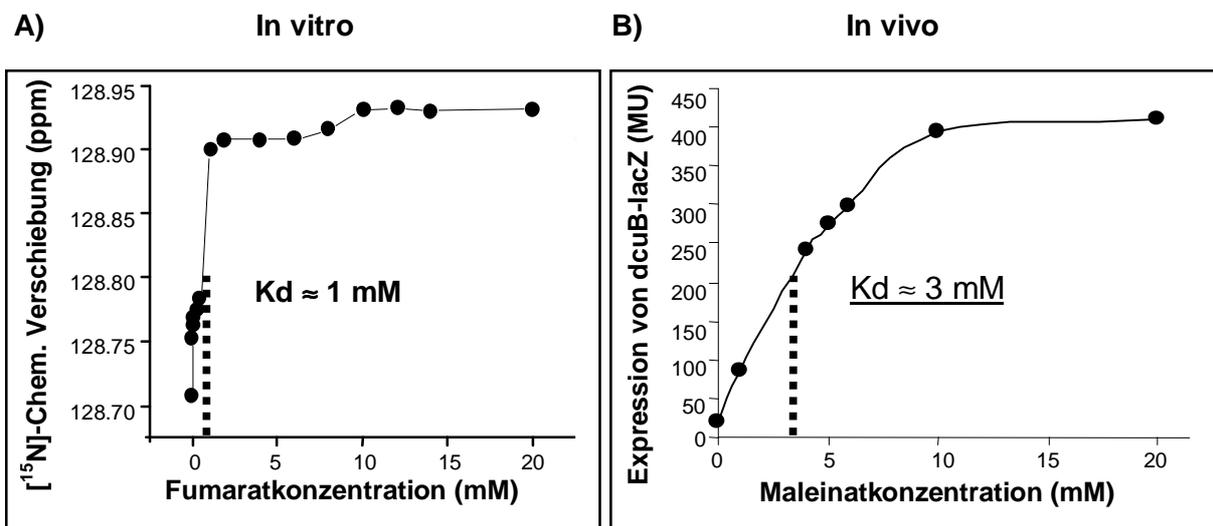


Abb. 22: Bestimmung des  $K_D$ -Wertes für die Effektorbindung von DcuS. (A) In vitro Bestimmung des  $K_D$ -Wertes für die Bindung von Fumarat an die periplasmatische Domäne von DcuS mit NMR-Spektroskopie. Es wurde der Grad der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit der Fumaratkonzentration gemessen. (B) In vivo Bestimmung des  $K_D$ -Wertes für die Bindung von Maleinat an DcuS. Es wurde die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität einer *dcuB-lacZ* Fusion (IMW237) nach anaerober Zucht mit Glycerin und DMSO und verschiedenen Maleinatkonzentrationen als induzierender Effektor gemessen.

### Untersuchung der Bindestelle durch Mutagenese

Die Aminosäuren der periplasmatischen Domäne, die in Anwesenheit von Fumarat eine Verschiebung im HSQC-Spektrum zeigten, waren überwiegend Argininreste (R107, R139 und R147). Die positive Ladung der Argininreste sollte dazu geeignet sein, die Carboxylgruppe von Fumarat zu binden. Damit sind diese Aminosäuren potentielle Kandidaten für die Fumaratbindung. Die Beteiligung dieser Aminosäuren an der Fumaratbindung wurde durch Mutagenese überprüft.

Die Argininreste wurden durch die Mutagenese gegen Isoleucin ausgetauscht. Dies erfolgte durch gerichtete Mutagenese der DNA der Codons für Arginin 139 und 147 einzeln und in Kombination. Die Mutagenese wurde in Plasmid pMW181 durchgeführt, das den Promotorbereich und die gesamte codierende Sequenz von DcuS enthält. So wurden die Plasmide pMW182 (DcuS mit R139I), pMW183 (DcuS mit R147I) und pMW184 (DcuS mit R139I und R147I) erhalten.

Die Mutanten wurden in vivo auf den Funktionszustand von DcuS getestet. Als Indikator wurde die Expression der *dcuB*'-'*lacZ* Fusion ausgewählt, deren Expression stark von DcuSR abhängig ist. In dem verwendeten Stamm IMW260 mit der chromosomalen *dcuB*'-'*lacZ* Fusion ist das chromosomale *dcuS* Gen deletiert. In diesen Stamm wurden die Plasmide mit mutiertem oder intaktem *dcuS* (pMW181) transformiert und die Expression von *dcuB* gemessen (Tab. 8). Die Messungen erfolgten unter induzierenden Bedingungen in Anwesenheit von Fumarat. Der Ausgangsstamm (*ducS*::*kan*<sup>R</sup>, *dcuB*'-'*lacZ*) zeigte keine Expression von *dcuB*'-'*lacZ*. Nach Transformation mit dem Plasmid mit intaktem *dcuS* (pMW181) stieg die Expression auf 112 Miller Units. Die Mutation von Arginin 139 hatte fast keinen Einfluß auf die Expression von *dcuB* im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutation von Arginin 147 hingegen führt zum vollständigen Verlust der Expression von *dcuB*. Die Doppelmutante (R139I und R147I) verhielt sich wie die Einzelmutante (R147I). Aus diesen Expressionsstudie läßt sich folgern, daß der Argininrest 147 für die Funktion von DcuS wichtig ist, Arginin139 hingegen nicht. Möglicherweise ist der Argininrest 147 deshalb an der Fumaratbindung beteiligt. Der Argininrest 147 befindet sich am Anfang des dritten  $\beta$ -Faltblattes der periplasmatischen Domäne von DcuS. Ob auch der Argininrest 107 Teil der Fumaratbindestelle ist, soll später ebenfalls durch Mutation getestet werden.

Stamm	Genotyp	Expression von <i>dcuB'</i> - <i>lacZ</i> (MU)
IMW260	DcuS <sup>-</sup>	7
IMW260 + pMW181	pDcuS <sup>+</sup>	112
IMW260 + pMW182	pDcuS <sup>+</sup> aber R139I	101
IMW260 + pMW183	pDcuS <sup>+</sup> aber R147I	5
IMW260 + pMW184	pDcuS <sup>+</sup> aber R139I, R147I	5

Tab. 8: Auswirkung der Mutationen in *dcuS* auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ*. IMW260 (*dcuB'*-*lacZ* und *dcuS*::*cam*<sup>R</sup>) wurde mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181) und den mutierten Derivaten (pMW182, pMW183 und pMW184) transformiert. Die Zucht erfolgte unter anaeroben Bedingungen in M9-Medium.

Die Struktur des mutierten DcuS Proteins soll in Zukunft durch NMR-Spektroskopie untersucht und mit der unmutierten periplasmatischen Domäne von DcuS (DcuS<sub>45-180</sub>) verglichen werden. Deshalb wurden Expressionsplasmide, die für die mutierten periplasmatischen Domänen kodieren, konstruiert. Aufbau der Plasmide und der kodierten periplasmatischen Domänen waren mit Ausnahme der mutierten Aminosäuren mit denen des Wildtyps identisch. Dazu wurden die Genabschnitte, die für die Aminosäuren 45 bis 180 in den Mutanten kodieren aus den Plasmiden pMW182 (DcuS mit R139I), pMW183 (DcuS mit R147I) und pMW184 (DcuS mit R139I und R147I) durch PCR amplifiziert und mit den eingefügten Restriktionsschnittstellen in das Plasmid pMW145 kloniert. So wurden die Plasmide pMW188, pMW189 und pMW190 erhalten. Damit konnten die mutierten periplasmatischen Domänen von DcuS wie für Wildtyp DcuS<sub>45-180</sub> beschrieben überproduziert und gereinigt werden. DcuS<sub>45-180</sub>(R139I), DcuS<sub>45-180</sub>(R147I) und DcuS<sub>45-180</sub>(R139I und R147I) sollen ebenfalls zur Strukturuntersuchung durch NMR-Spektroskopie eingesetzt werden.

### Rekonstitution und Phosphorylierungsaktivität von DcuSR

#### **Überproduktion und Reinigung von DcuS und DcuR**

Wichtige Eigenschaften von Zweikomponentensystemen sind die Auto-phosphorylierungsaktivität der Sensorkinase und die Übertragung des Phosphatrestes auf den Responeregulator. Um die Bedingungen für solche Phosphorylierungsreaktionen näher untersuchen zu können, wurde ein in vitro Testsystem etabliert. Dazu wurden DcuS und DcuR isoliert und die Sensorkinase in die Membran

von Liposomen eingebaut. In einem solchen System kann die Biochemie und Funktion der membranständigen Sensorkinase unter definierten Bedingungen untersucht werden.

Die Voraussetzung für die Herstellung solcher Proteoliposomen war die Isolierung größerer Mengen von gereinigtem DcuS-Protein. Zu diesem Zweck wurde das Expressionsplasmid pMW151 konstruiert, das die Überproduktion von DcuS als Fusionsprotein mit einem N-terminalem His<sub>6</sub>-tag erlaubt.

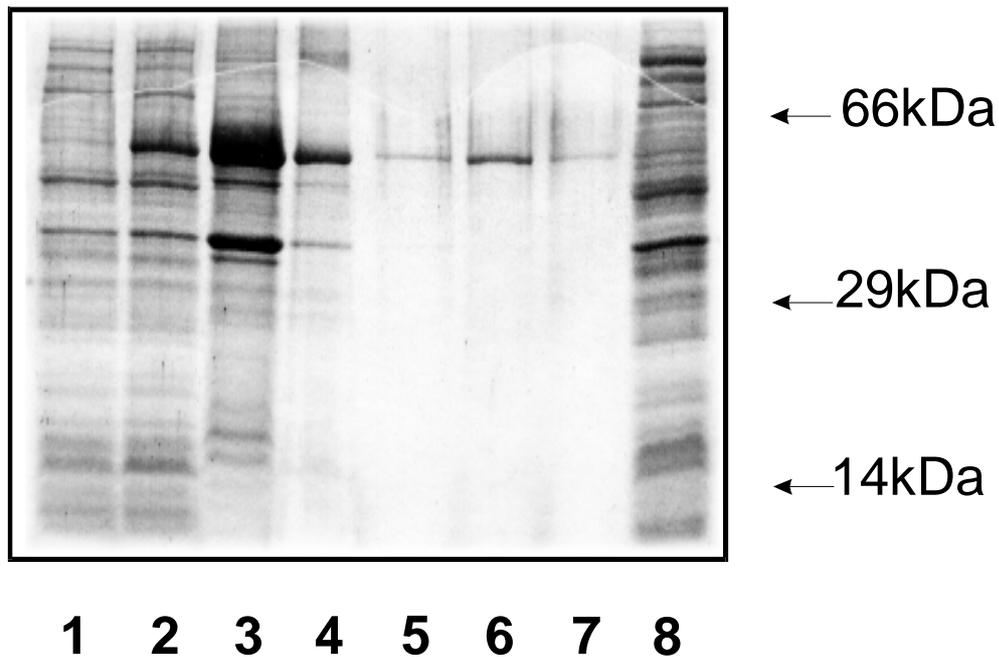


Abb. 23: Überproduktion und Reinigung von DcuS-His<sub>6</sub> aus *Escherichia coli* BL21DE3 (pMW151). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und nach Coomassie gefärbt.  
Spur:

1: Zellhomogenat vor der Induktion	10 µg Protein
2: Zellhomogenat nach 3 Std. Induktion mit IPTG	12 µg Protein
3: Membranfraktion vor der Solubilisierung	20 µg Protein
4: Membranfraktion nach der Solubilisierung	9 µg Protein
5: Eluat der Ni-NTA-Agarose-Säule, Fraktion 1	0,5 µg Protein
6: Eluat der Ni-NTA-Agarose-Säule, Fraktion 2	2 µg Protein
7: Eluat der Ni-NTA-Agarose-Säule, Fraktion 3	0,5 µg Protein
8: Durchlauf der Ni-NTA-Agarose-Säule	17,5 µg Protein

Plasmid pMW151 enthielt die vollständige Sequenz von *dcuS* in dem Expressionsvektor pET28a. Die Expression wurde im Stamm BL21DE3 induziert und zeigte im SDS-Gel eine deutliche Proteinbande bei ca. 61 kDa (Abb. 23) mit der erwarteten Größe von DcuS. Das Membranprotein DcuS befand sich in der unlöslichen Fraktion des Zellhomogenats und wurde mit einem Detergenz solubilisiert. Die Solubilisierung erfolgte aus der Membranfraktion mit einer 2 %

Lösung des Detergenz Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) oder mit einer 2 % Lösung des Detergenz Empigen BB. Die gelösten Membranproteine wurden auf eine Ni<sup>2+</sup>-Chelat-Säule aufgetragen. Nach Abwaschen anderer Proteine wurden die gebundenen Proteine mit 0,5 M Imidazol eluiert. Im Elutionspuffer befand sich 0,58 % Dodecylmaltosid (DM) als Detergenz. Somit wurde das Detergenz während der Affinitätschromatographie ausgetauscht. Die Proteinfractionen, die mit Imidazol eluiert wurden, enthielten ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 61 kDa, das in der Proteinfärbung > 95 % des Proteins in diesen Fractionen ausmachte. Aus einem Liter Zellkultur konnten 4 mg gereinigtes DcuS isoliert werden.

Der Response-Regulator DcuR wurde in gleicher Weise gereinigt, jedoch ohne Zusatz von Detergenz. Als lösliches Protein befand sich DcuR hauptsächlich im Überstand des Zellhomogenats und konnte direkt aus der löslichen Zellfraction mit der Ni<sup>2+</sup>-Chelat-Säule gereinigt werden. Ein Teil des überproduzierten DcuR lag allerdings in Form von unlöslichen „Inclusion bodies“ vor und wurde mit der Membranfraction abgetrennt. Aus einem Liter Zellkultur wurden 30 mg gereinigtes DcuR isoliert (Abb. 24).

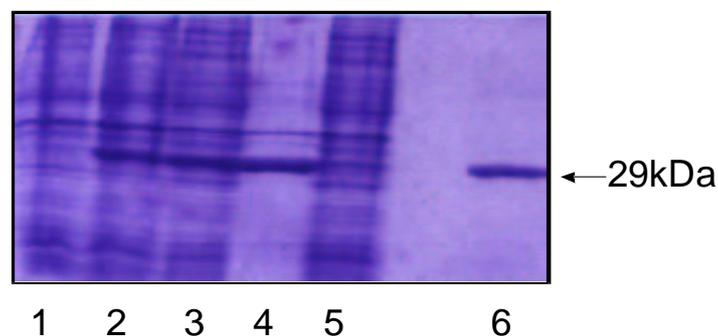


Abb. 24: Überproduktion und Reinigung von DcuR-His<sub>6</sub> aus *Escherichia coli* BL21DE3 (pMW180). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und nach Coomassie gefärbt.  
Spur:

1: Zellhomogenat vor der Induktion	30 µg Protein
2: Zellhomogenat nach 3 Std. Induktion mit IPTG	35 µg Protein
3: lösliche Fraction	40 µg Protein
4: Membranfraction	7 µg Protein
5: Durchlauf der Ni-NTA-Agarose-Säule	30 µg Protein
6: Elution der Ni-NTA-Agarose-Säule	5 µg Protein

## **Entwicklung eines in vitro Testsystems zur Charakterisierung von DcuSR**

Bei der Untersuchung der Phosphorylierung von DcuS und des Phosphoryltransfers auf DcuR in vitro können einzelne Parameter gezielt verändert und quantitativ bestimmt werden. Zur Gewinnung eines funktionellen in vitro Systems muß DcuS in Membranen oder Liposomen rekonstituiert werden. Damit sollten die gleichen strukturellen Voraussetzungen wie in der Bakterienzelle gegeben sein.

Zur Rekonstitution wurden zunächst Liposomen hergestellt. Aus *E. coli* isolierte Phospholipide wurden in Octylglycosid gelöst. Bei der langsamen Entfernung von Octylglycosid durch Dialyse lagerten sich die Phospholipidmoleküle spontan zu Membranen zusammen. Für die anschließende Rekonstitution von DcuS in die Liposomen wurde die Methode von Jung und Altendorf (1997) in veränderter Form verwendet. Die Liposomen wurden mit geringen Mengen Triton X-100 oder mit Dodecylmaltosid als Detergenz inkubiert. Das Detergenz bewirkte eine Destabilisierung der Membranen und Einlagerung der Membranproteine in die Membranen. Dieser Zustand der Liposomen wird als „onset“-Solubilisierung (Rigaud *et al.*, 1995) bezeichnet und läßt sich durch Erniedrigung der optischen Dichte am Photometer verfolgen. Zu den so vorbereiteten Liposomen wurde gereinigtes DcuS in Elutionspuffer gegeben. Das Detergenz wurde mit Bio Beads (Holloway, 1973) langsam entfernt. Die so geschaffenen Proteoliposomen wurden dann mit einem Funktionstest für DcuS überprüft. Die wichtigste Funktion einer Sensorkinase ist die Phosphorylierbarkeit in Anwesenheit von Substrat.

## **Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DcuS und DcuR**

Die Aktivität und Funktion der Sensorkinase DcuS wurde nach dem Einbau in Liposomen überprüft. Physiologisch aktives DcuS sollte in Anwesenheit vom Fumarat und ATP autophosphoryliert werden. Bei Zweikomponentensystemen wie DcuSR, sollte der Phosphatrest dann spezifisch auf den Responseregulator DcuR übertragen werden.

Bei der Rekonstitution in Liposomen werden Membranproteine häufig so in Liposomen eingelagert, daß große wasserlösliche Domänen zur Außenseite der Liposomen orientiert sind (Jung *et al.*, 1997). Wegen der großen cytoplasmatischen Domäne von DcuS war zu erwarten, daß diese in den Proteoliposomen nach außen,

und der kleinere periplasmatische Teil nach innen orientiert ist. Bei dieser Orientierung ist die Kinasedomäne von außen für ATP zugänglich, während der Effektor (Fumarat) nicht an die Bindedomäne gelangt. Fumarat diffundiert nur sehr langsam durch Phospholipidmembranen (Abb. 19). Deshalb wurden die Proteoliposomen mit 20 mM Fumarat inkubiert und mehrfach eingefroren und langsam wieder aufgetaut. Mit dieser Methode werden die Liposomen vergrößert (Rigaud *et al.*, 1995) und gleichzeitig wird eine Vermischung zwischen innerem und äußerem Puffer der Liposomen erzielt.

Bei so vorbereiteten Liposomen wurden nach Zugabe von radioaktivem  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  die Phosphorylierung von DcuS gemessen. Dazu wurde das Protein der Proteoliposomen in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Radioaktivität mit einem Phosphoimager detektiert. Es wurde die Phosphorylierung von gereinigtem solubilisiertem DcuS und mit rekonstituiertem DcuS verglichen. Rekonstituiertes DcuS zeigte in Gegenwart von Fumarat bereits nach 5 Minuten eine radioaktive Bande, die mit der Position des DcuS Proteins übereinstimmte. Die Intensität der Bande nahm mit der Inkubationsdauer zu (Abb. 25). In Detergenz gelöstes DcuS hingegen zeigte keine Phosphorylierung, obwohl es in zehnfach höherer Konzentration als rekonstituiertes DcuS vorlag. Nur rekonstituiertes DcuS liegt also in aktiver Form vor und kann durch ATP autophosphoryliert werden.

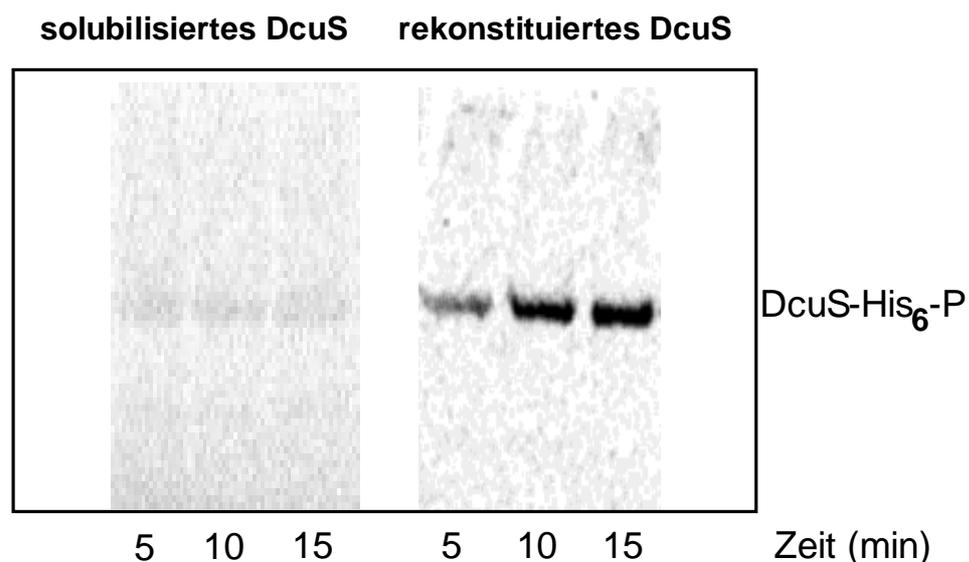


Abb. 25: Vergleich der Phosphorylierung von solubilisiertem und rekonstituiertem DcuS-His<sub>6</sub>. 20  $\mu\text{g}$  DcuS wurden in Dodecylmaltosid solubilisiert bzw. 2  $\mu\text{g}$  DcuS in Liposomen rekonstituiert und die Phosphorylierungsreaktion durch Zugabe von 100 nM  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  gestartet. Die Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Radioaktivität mit einem Phosphoimager detektiert.

In gleicher Weise wurde eine Kinetik der Phosphorylierung von DcuS und des Phosphoryltransfers auf DcuR aufgenommen. Von einem Phosphorylierungsansatz von DcuS in Proteoliposomen wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben genommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Nach 30 Minuten wurde zu dem Phosphorylierungsansatz gereinigtes DcuR gegeben und erneut Proben genommen. Die Abbildung 26a zeigt das SDS-Gel nach Proteinfärbung. In jeder Spur ist die gleiche Menge DcuS mit oder ohne DcuR aufgetragen.

Abbildung 26b zeigt das gleiche Gel nach Auswertung der radioaktiven Banden durch den Phosphoimager. Mit zunehmender Zeit steigt der Gehalt an phosphoryliertem DcuS kontinuierlich an. Nach Zugabe von DcuR verliert DcuS die Radioaktivität, die sehr schnell auf DcuR übertragen wird. Eine quantitative Auswertung der Phosphorylierung mit  $^{33}\text{P}$ -Phosphat ist in Abbildung 26c gezeigt. Man erkennt einen nahezu linearen Anstieg der Phosphorylierung von 3 bis 30 Minuten und die anschließende schnelle Dephosphorylierung durch DcuR.

Um die Phosphorylierung quantitativ zu bestimmen, wurden die Banden ausgeschnitten und deren Radioaktivität im Szintillationszähler quantitativ gemessen. Zu diesem Zweck wurden die ausgeschnittenen Gelstücke aufgelöst und deren Radioaktivität gemessen. Auch mit dieser Auswertung ist der lineare Anstieg der Radioaktivität und die rasche Abnahme nach Zugabe von DcuR zu erkennen (Abb. 27). Aus den Daten läßt sich der Anteil an phosphoryliertem DcuS berechnen. Dabei entsprach 1 pmol  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  16700 Bq. Nach 60 Minuten wurde bei der Phosphorylierung von DcuS 20 Bq gemessen, entsprechend 1 fmol gebundenem Phosphat. In jeder Probe befanden sich 42 pmol DcuS, so daß jedes vierzigtausendste Molekül von DcuS phosphoryliert wurde.

Das rekonstituierte DcuS ist also zumindest teilweise aktiv und zeigt mit der Phosphorylierung und Dephosphorylierung die typischen Eigenschaften eines Zweikomponentensystems. Somit steht ein aktives „in vitro“ Testsystem zur Verfügung, das für weitere Untersuchungen zur Funktionsweise von DcuS eingesetzt werden kann.

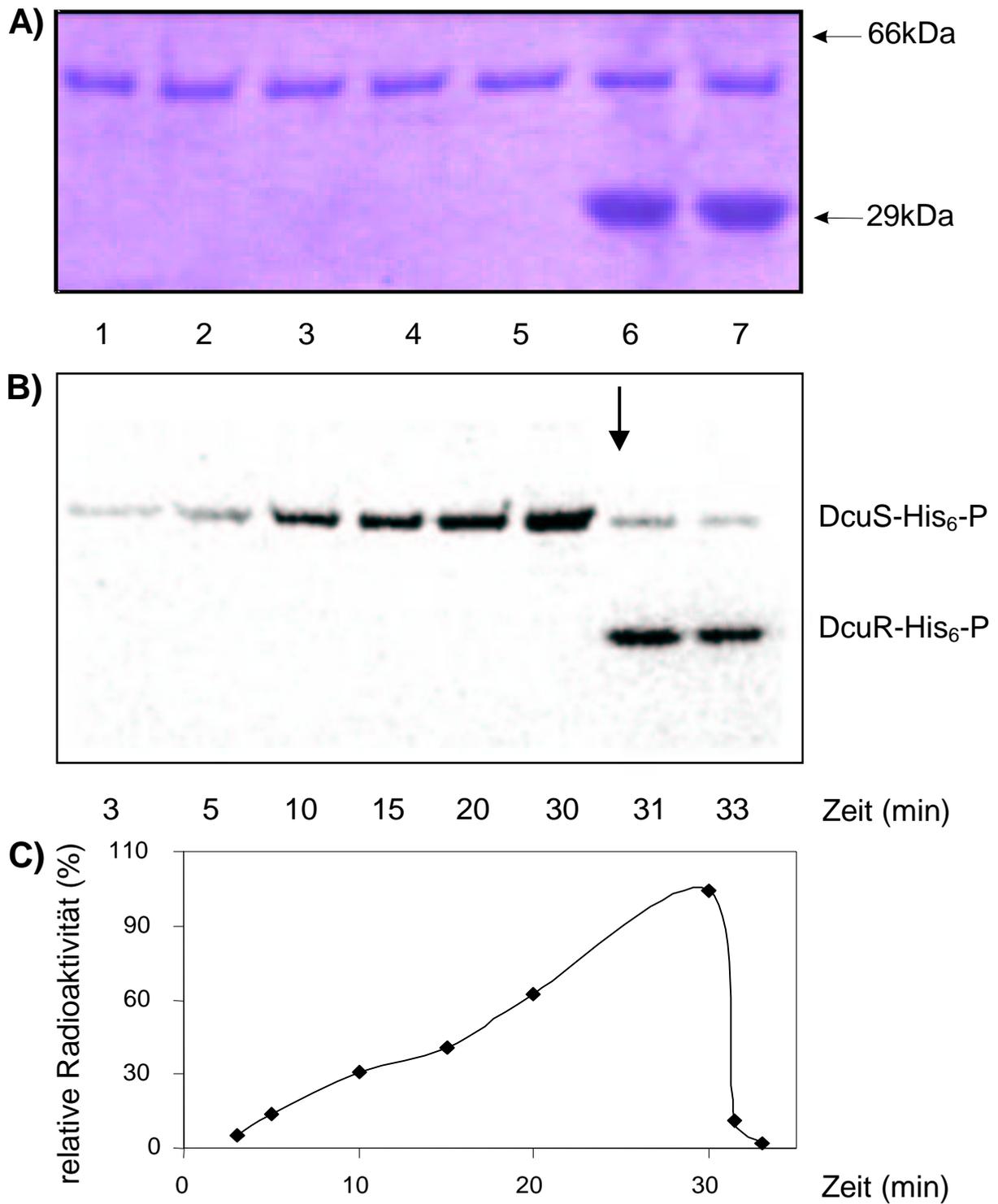


Abb. 26: Kinetik der Phosphorylierung von gereinigtem DcuS-His<sub>6</sub> in Proteoliposomen und Phosphotransfer zu DcuR-His<sub>6</sub>. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 nM  $\gamma$ -[<sup>33</sup>P]-ATP gestartet. Nach 31 min erfolgte die Zugabe von gereinigtem DcuR-His<sub>6</sub>. Die Proteine (2  $\mu$ g DcuS-His<sub>6</sub> / Spur und 8  $\mu$ g DcuR-His<sub>6</sub> / Spur) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt (A), die Radioaktivität mit einem Phosphorimager detektiert (B) und quantitativ bestimmt (C). Die Intensität der Banden ist dabei proportional zu Menge an gebundenem <sup>33</sup>P und kann mit dem Phosphorimager ausgewertet werden. Die relative Radioaktivität von DcuS-His<sub>6</sub> wurde in jeder Bande bestimmt. Der höchste Wert (bei 30 min) wurde 100 % gesetzt.

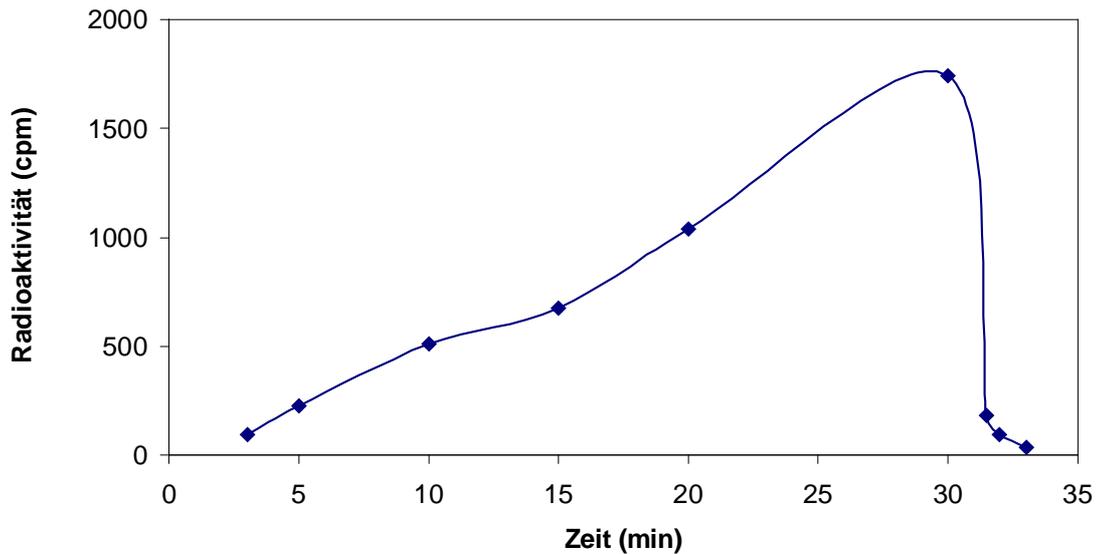


Abb. 27: Kinetik der Phosphorylierung von gereinigtem DcuS-His<sub>6</sub> in Proteoliposomen und Bestimmung der absoluten Radioaktivität. Die Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, nach Coomassie gefärbt und die Proteinbanden ausgeschnitten. Nach Auflösen der Gelstücke in Wasserstoffperoxid und Zugabe von Szintillatorlösung wurden die Proben im Beckmann Counter LS 6000SC gemessen.

### Substratspezifität der Sensorkinase DcuS

Die beschriebenen Experimente zur Phosphorylierung von DcuS und des Phosphoryltransfers auf DcuR wurden in Gegenwart von Fumarat durchgeführt. Mit diesem *in vitro* Testsystem wurde die Abhängigkeit der Phosphorylierung von DcuS von einem Effektor und die Substratspezifität von DcuS bestimmt. Dazu wurde die Phosphorylierungsaktivität von rekonstituiertem DcuS in Gegenwart verschiedener Effektoren verglichen (Abb. 28). Mit Fumarat als Effektor war die Phosphorylierung von DcuS um den Faktor 2 gegenüber der Phosphorylierungsgeschwindigkeit ohne Effektor erhöht. Nur Succinat konnte eine ähnliche hohe Autophosphorylierung von DcuS bewirken. Die Aktivität betrug etwa 80 % der von Fumarat. Ohne Zusatz eines Effektors lag die Phosphorylierung bei 50 %. Mit Citrat, Propionat und Malat wurde eine leichte Stimulierung der Phosphorylierung gemessen. Andere Carbonsäuren (Tartrat, Formiat, Acetat) schienen die Phosphorylierung sogar zu hemmen. Eine ähnlich hohe Grundaktivität der Phosphorylierung wurde auch für andere Zweikomponenten-Sensoren beschrieben. Nur Fumarat und Succinat scheinen damit *in vitro* effektiv eine Steigerung der Autophosphorylierung von DcuS zu bewirken. *In vivo* wird die Expression von *dcuB* durch Fumarat, aber auch durch alle anderen C<sub>4</sub>-Dicarboxylate induziert (Zientz *et al.*, 1998). Da die substratinduzierte Expression von

*dcuB* fast vollständig der Regulation durch DcuS unterliegt, sollte auch DcuS diese Substrate erkennen.

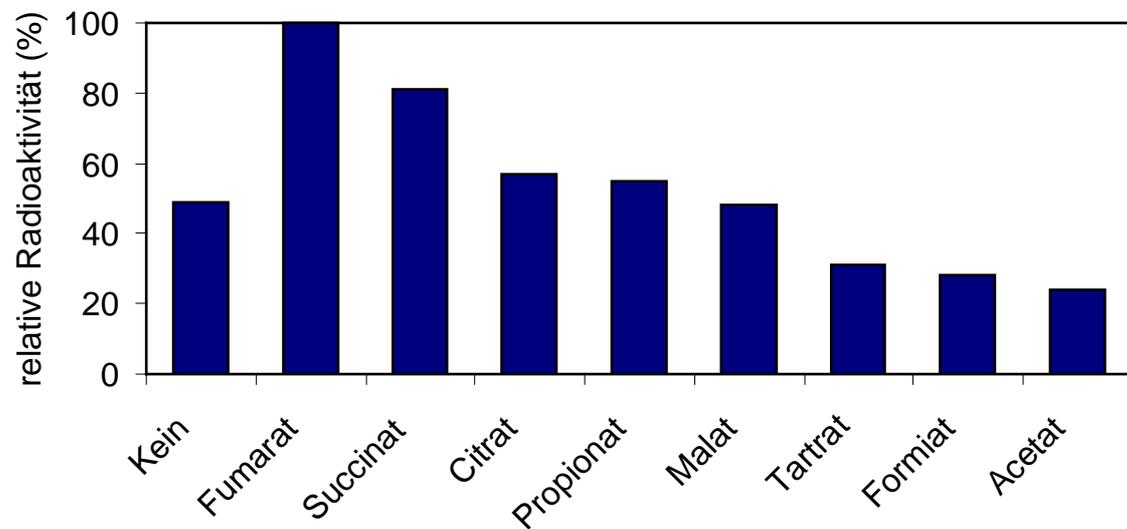


Abb. 28: Phosphorylierung von DcuS in Proteoliposomen in Abhängigkeit von verschiedenen Effektoren. Die Reaktion wurde mit 20 mM Effektor und durch Zugabe von 100 nM  $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ -ATP gestartet. Die relative Radioaktivität wurde nach 15 min mit dem Phosphoimager bestimmt und der höchste Wert (mit Fumarat) wurde 100 % gesetzt.

## 5. Diskussion

Zwei Drittel der 286 Transportproteine von *Escherichia coli* sind sekundäre Carrier (Saier, 1999). Diese können aufgrund von Sequenzhomologien in Familien eingeteilt werden. Carrier innerhalb einer Familie transportieren meist ähnliche Substrate und für ein Substrat sind oft mehrere Carrier vorhanden.

Die C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier der Proteobakterien können nach ihrer Proteinsequenz in fünf Familien eingeteilt werden: Die DctA-, die DcuAB-, die DcuC-, die CitT- und die TRAP-Familie (Abb. 29). Die DctA Familie ist eine Untergruppe der DAACS Familie (dicarboxylate/amino acid:cation symporter). DctA Carrier katalysieren den Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten hauptsächlich im Symport mit H<sup>+</sup> oder Na<sup>+</sup> Ionen. Innerhalb der DctA Familie bilden die Carrier aus Gram positiven Organismen eine eigene Untergruppe.

Die Mitglieder der DcuAB Familie haben 23 % identische Aminosäuren und katalysieren Aufnahme und Gegentausch von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten. DcuA und DcuB Carrier bilden Untergruppen der DcuAB Familie und kommen nur bei anaeroben oder fakultativ anaeroben Organismen vor, die Fumaratatmung betreiben.

Die kleine Gruppe der DcuC Carrier sind mit der DcuAB Familie verwandt (9% identische Aminosäuren). Nur DcuC aus *E. coli* wurde bislang näher charakterisiert und ist möglicherweise ein C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Effluxcarrier (Zientz *et al.*, 1996, 1999). Bei neuen Sequenzierungsprojekten von nahe verwandten Organismen wurden weitere mögliche Mitglieder der DcuC Familie entdeckt. So zeigten Sequenzvergleiche mit *Pasteurella multodica* (May *et al.*, 2001) und *Vibrio cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000) *dcuC* ähnliche Gene (Abb. 29). Genetische oder biochemische Untersuchungen zur Funktion dieser potentiellen Carrier gibt es aber noch nicht.

Die TRAP Familie (Tripartite ATP-independent periplasmatic transporter) ist eine neue Klasse von sekundären Carriern, die aus zwei integralen Membranproteinen und einem periplasmatischem Bindeprotein bestehen (Rabus *et al.*, 1999, Kelly *et al.*, 2001). Besonders der DctPQM Transporter aus *Rhodobacter capsulatus* ist gut untersucht und als C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier beschrieben (Forward *et al.*, 1993, 1997). *DctPQM*-ähnliche Gene wurden auch in *E. coli* gefunden, aber ihre Beteiligung am aeroben Succinattransport konnte kürzlich ausgeschlossen werden (Davies *et al.*, 1999). Die Carrier der CitT Familie katalysieren einen Citrat oder Tartrat Antiport mit

Succinat und sind eine Unterfamilie der DASS Carrier (Divalent Anion: Na<sup>+</sup> Symporter), die hauptsächlich in Eukaryoten vorkommen.

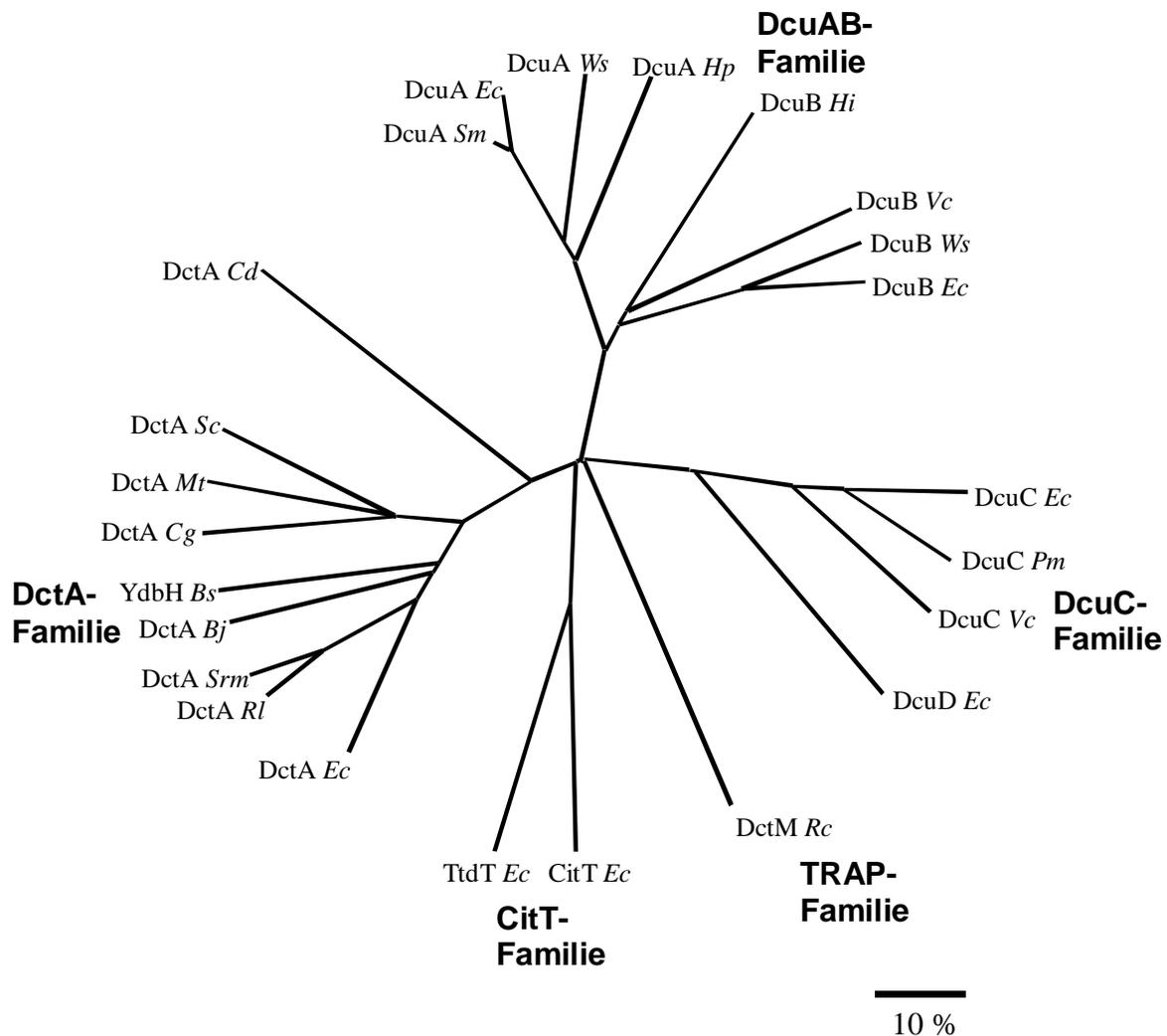


Abb. 29: Verwandtschaftsverhältnisse der bakteriellen C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier der DctA, DcuAB, DcuC, CitT und TRAP Familien. Es wurden die Proteinsequenzen mit dem Programm Clustal W verglichen und der Stammbaum mit dem Programm Phylip gezeichnet. Der Maßstab gibt den Abstand für 10 % Unterschied in der Aminosäuresequenz an.

Abkürzungen: *Bj*, *Bradyrhizobium japonicum*; *Bs*, *Bacillus subtilis*; *Cd*, *Corynebacterium diphtheriae*; *Cg*, *Corynebacterium glutamicum*; *Ec*, *Escherichia coli*; *Hi*, *Haemophilus influenzae*; *Hp*, *Helicobacter pylori*; *Mt*, *Mycobacterium tuberculosis*; *Pm*, *Pasteurella multocida*; *Rc*, *Rhodobacter capsulatus*; *Rl*, *Rhizobium leguminosarum*; *Sc*, *Streptomyces coelicolor*; *Sm*, *Serratia marcescens*; *Srm*, *Sinorhizobium meliloti*; *Vc*, *Vibrio cholerae*; *Ws*, *Wolinella succinogenes*.

### Der C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier DcuD

In *E. coli* waren für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate die Carrier DcuA, DcuB, DcuC, CitT und DctA bekannt (Engel *et al.*, 1992, 1994, Six *et al.*, 1994, Zientz *et al.*, 1996, 1999, Pos *et al.*, 1998, Kay *et al.*, 1971, Golby *et al.*, 1998, Davies *et al.*, 1999).

Durch Sequenzvergleiche konnte ein weiterer Carrier (DcuD) gefunden werden, der hohe Sequenzähnlichkeit zu DcuC zeigt (Abb. 29). Ob DcuD am Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten oder ähnlichen Substraten beteiligt ist, wurde mit Expressionsstudien untersucht. Es wurden viele verschiedene Substrate (Mono-, Di- und Tricarboxylate, Aminosäuren, Aminosucker) und Wachstumsbedingungen (Temperatur, Salzgehalt, pH-Wert, Wachstumsphase) getestet, aber es wurde keine signifikante Expression von *dcuD* gefunden. Es wurden auch Mutanten von *dcuD* konstruiert. Das Wachstumsverhalten von *dcuD* Mutanten, sowohl als Einzelmutante als auch in Kombination mit den bekannten Dicarboxylatcarriern, zeigte dabei keinen Unterschied zum entsprechenden Wildtyp.

Wegen der fehlenden Expression unter allen getesteten verhält sich *dcuD* wie ein kryptisches Gen. Kryptische Gene sind definiert als intakte Gene, die nicht unter den Bedingungen exprimiert werden, unter denen homologe Gene exprimiert werden (Bender, 1996, Hinton, 1997).

Eine Analyse der „Kodonnutzung“ mit Hilfe des CAI-Wertes (codon adaptation index, Sharp *et al.* 1987) ergab einen Wert von 0,26. CAI-Werte im Bereich von 0,3 sind typisch für Gene mit sehr geringer Expression. So zeigt auch *dcuC* (0,34) nur geringe Expression und Transportaktivität (Zientz *et al.*, 1999). Normal exprimierte Gene liegen dagegen im Bereich von 0,5 (*dcuA* 0,54 und *dcuB* 0,41). Der geringe CAI-Wert ist ein weitere Hinweis auf fehlende oder geringe Expression von *dcuD*.

Es wurden auch Naturisolate von *E. coli* auf funktionelle *dcuD* Gene untersucht da manche kryptischen Gene aus Laborstämmen von *E. coli* in Naturisolaten exprimiert werden. So wird beispielsweise das Gen *ilvG*, das für die Acetohydroxylsäure-Kinase-II kodiert, nur in Naturisolaten exprimiert. In Laborstämmen wird die Expression durch Mutationen des Promotors verhindert (Hall *et al.*, 1983). Bei *dcuD* konnte jedoch auch in Naturisolaten keine Expression gefunden werden. Ein Vergleich der Sequenz der Promotorregion von *dcuD* und *dcuD<sub>nat</sub>* zeigte nur geringfügige Unterschiede, und der  $\sigma^{70}$  Promotor ist in beiden Fällen schlecht konserviert.

Manche kryptischen Gene werden durch spontane Insertionssequenzen aktiviert. So wird das *bgl* Operon ( $\beta$ -Glucosidase Stoffwechsel) normalerweise durch flankierende Sequenzelemente inaktiviert (Schnetz *et al.*, 1995, 1996). Durch Insertion von IS1 oder IS5 Elementen kann das Operon aktiviert werden (Schnetz *et al.*, 1992). Auch von *dcuC* wurden Mutanten mit IS5 Elementen isoliert, die höhere Expression zeigten (Zientz *et al.*, 1996, 1999). Solche spontanen Mutanten konnten jedoch für

*dcuD* nicht gefunden werden. Diese Befunde deuten alle darauf hin, daß es sich bei *dcuD* um ein kryptisches Gen handelt. Wenn das *dcuD* Gen von einem Expressionsplasmid exprimiert wurde, konnte ein Protein der erwarteten Größe gebildet werden. Aber auch dieses DcuD-Protein konnte den Ausfall von anderen Dicarboxylatcarriern im Stamm IMW153 (*dcuA dcuB dcuC*) nicht komplementieren. Zu der DcuC Familie gehört noch ein hypothetisches Gen aus *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), das aus zwei benachbarten Genen oder Genfragmenten (*y0585* und *y0586*) durch Fusion gebildet werden kann. So wird *dcuC* nur noch mäßig exprimiert, *dcuD* ist vermutlich ein kryptisches Gen und *y0585* / *y0586* aus *H. influenzae* wurde in zwei Genfragmente geteilt und damit endgültig inaktiviert. Diese natürliche Inaktivierung muß also nach der evolutionären Trennung der Spezies *H. influenzae* und *E. coli* vor ca. 680 Mio Jahren erfolgt sein. Abb. 30 zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse aller bisher bekannten Proteine der DcuC Familie.

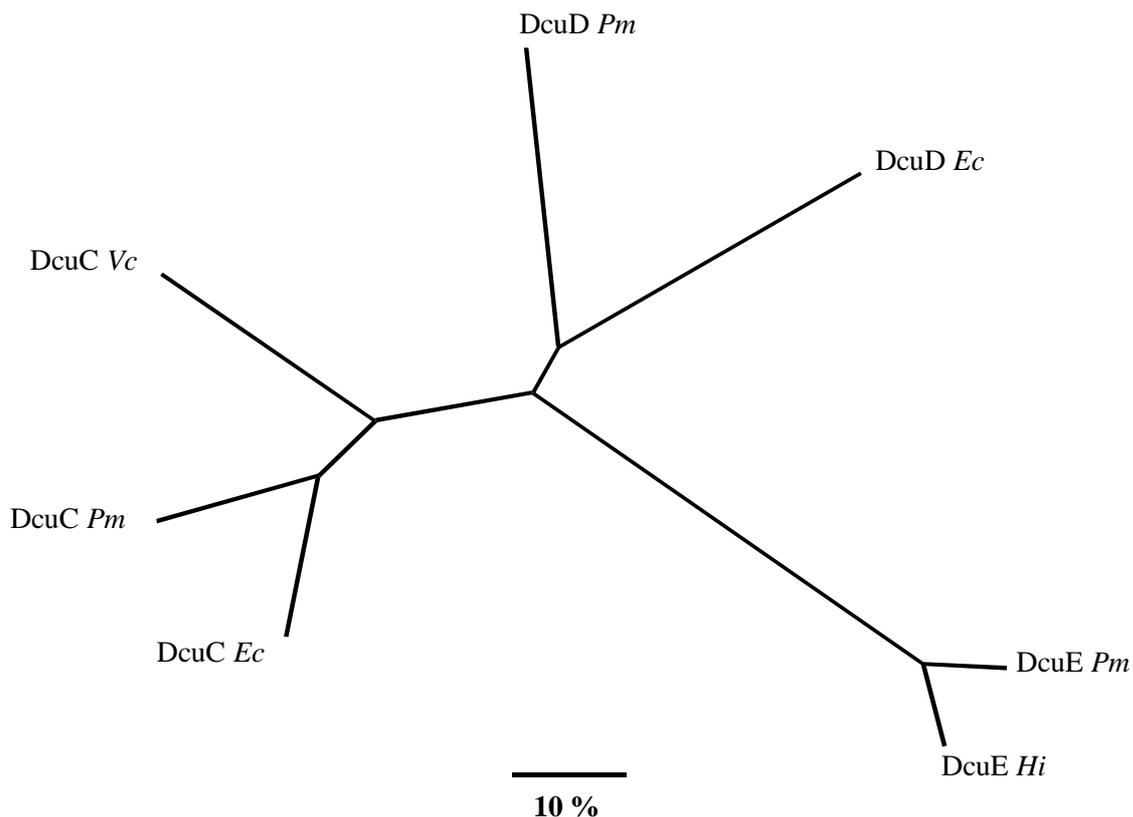


Abb. 30: Verwandtschaftsverhältnisse der C<sub>4</sub>-Dicarboxylatcarrier der DcuC Familie. Es wurden die Proteinsequenzen mit dem Programm Clustal W verglichen und der Stammbaum mit dem Programm Phylip gezeichnet. Der Maßstab gibt den Abstand für 10 % Unterschied in der Aminosäuresequenz an. DcuD *Pm* bezeichnet das hypothetische Protein von Orf 0933 und DcuE *Pm* das hypothetische Protein Orf 1299 von *P. multocida*. DcuE *Hi* steht für ein hypothetische Fusionsprotein, das aus den Proteinen Y0585 und Y0586 gebildet werden kann. Abkürzungen: *Ec*, *Escherichia coli*; *Hi*, *Haemophilus influenzae*; *Pm*, *Pasteurella multocida*; *Vc*, *Vibrio cholerae*

Nur die Organismen *E. coli*, *Pasteurella multodica* und *Vibrio cholerae* besitzen DcuC ähnliche Carrier. Innerhalb der DcuC Familie bilden diese drei Proteine eine Untergruppe. Darüber hinaus gibt es in *P. multodica* einen DcuD ähnlichen Carrier. *P. multodica* besitzt außerdem ein Protein, das große Homologien zu dem hypothetischen Proteinprodukt der Gene *y0585* und *y0586* aus *H. influenzae* aufweist, aber noch nicht in zwei Fragmente geteilt ist.

Die große Ähnlichkeit dieser beiden DcuD-ähnlichen Proteine ist verständlich, da *P. multodica* und *H. influenzae* sehr nah verwandte Organismen sind, die sich erst vor ca. 270 Mio Jahren phylogenetisch getrennt haben. Diese beiden Proteine unterscheiden sich bereits in ihrer Sequenz von den bekannten DcuC und DcuD-Proteinen (Abb. 30). Die Sequenzunterschiede dieser Proteine zu DcuD sind größer als die zwischen DcuC und DcuD. Deshalb erscheint es gerechtfertigt, diese Proteine in eine neue Untergruppe (DcuE) einzuordnen (Abb. 30). Die Carrier der DcuC Familie lassen sich also aufgrund ihrer Proteinsequenz in die drei Untergruppen DcuC, DcuD und DcuE einteilen.

### **DctA unabhängiger Succinattransport**

Unter aeroben Bedingungen werden in *E. coli* C<sub>4</sub>-Dicarboxylate durch DctA transportiert. Mutanten von DctA waren nicht mehr in der Lage mit Fumarat oder Succinat zu wachsen. Züchtete man die Mutanten jedoch bei saurem pH-Wert (pH 6) konnte das Wachstum mit Succinat wiederhergestellt werden. Das Wachstum erfolgte unter diesen Bedingungen auch durch Mehrfachmutanten (DctA, DcuA, DcuB, DcuC und DcuD oder CitT), denen alle bekannten Carrier für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate fehlten. Wie ist der Transport von Succinat bei saurem pH zu erklären? In der Literatur wurde beschrieben, daß Succinat bei pH 6 als zyklisches Monoanion vorliegt. In diesem zyklischen Anion wird die negative Ladung maskiert und es wurde gezeigt, daß Succinat in dieser Form durch Phospholipidmembranen diffundieren kann. Diese Diffusion reicht aus, ein elektrisches Diffusionspotential über der Membran aufzubauen (Kaim *et al.*, 1998, 1999). Es wurde überprüft, ob die Diffusionsgeschwindigkeit von Succinat auch ausreicht, das Wachstum der *dctA* Mutante mit Succinat bei pH 6 zu gewährleisten. Eine fast lineare Abhängigkeit des Transports in der Fünffachmutante IMW244 (DctA, DcuA, DcuB, DcuC, DcuD) von der Substratkonzentration schien für eine Diffusion zu sprechen. Die Diffusion jedoch sollte durch

Entkoppler nicht beeinflusst werden. Auch unterschiedliche Zuchtbedingungen der Zellen sollten sich nicht auf die Diffusion auswirken. Der Transport von Succinat in Zellsuspensionen wurde aber fast vollständig durch Entkoppler gehemmt und bei glucosegezüchteten Zellen waren die Transportraten deutlich geringer, als bei succinatgezüchteten Zellen. Bei dem Transport handelt es sich damit um ein aktives Transportsystem, das durch Glucose reprimiert wird und abhängig vom Membranpotential ist.

Die Diffusionsgeschwindigkeit von Succinat bei pH 6 wurde in Liposomen direkt bestimmt. In Liposomen kann jede Beteiligung von unbekanntem Carriern ausgeschlossen werden. Die Diffusionsgeschwindigkeit von Succinat war in diesen Liposomen sehr klein ( $0,1 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg Phospholipid}$ ), und betrug damit nur  $1 / 1000$  des Succinattransports in der Fünffachmutante. Damit ist die Diffusion völlig unzureichend, um die hohen Transportraten und das Wachstum der *dctA* Mutante auf Succinat zu erklären. Es wurden Liposomen aus *E. coli*-Phospholipidgemisch und aus Sojabohnen-Phospholipid getestet. Das *E. coli*-Phospholipidgemisch besteht hauptsächlich aus Phosphatidylethanolamin, während Phospholipid aus Sojabohnen vorwiegend Phosphatidylcholin enthalten. Die Zusammensetzung der Phospholipide hatte dabei keinen Einfluß auf die Diffusionsgeschwindigkeit von Succinat oder Fumarat durch die Membran.

Die Substratspezifität des Transportsystems der Mutante unterschied sich deutlich vom Wildtyp. Bei der Mutante wurde die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat besonders durch Monocarboxylate und Succinat gehemmt. Die Konkurrenz durch Monocarboxylate und die Bevorzugung von saurem pH-Wert deuten darauf hin, daß Succinat als Monoanion von einem Monocarboxylatcarrier transportiert wird. Succinat hat einen deutlich höheren  $\text{pK}_2$ -Wert (5,6) als Fumarat ( $\text{pK}_2 = 4,5$ ) und Malat ( $\text{pK}_2 = 5,1$ ). Deshalb liegen Fumarat und Malat bei pH 6 hauptsächlich als Dianionen vor und werden von dem Monocarboxylattransporter nicht akzeptiert. Das könnte auch die kompetitive Hemmung des Succinattransports durch das unphysiologische Substrat Maleinat erklären, das einen hohen  $\text{pK}_2$ -Wert aufweist ( $\text{pK}_2 = 6,5$ ) und bei pH 6 als Monoanion vorliegt.

Ein Transportsystem mit ähnlichen Eigenschaften wurde in *Pseudomonas lemogni* beobachtet (Terpe *et al.*, 1999). *P. lemogni* besitzt ebenfalls einen Carrier für Succinat mit einem pH-Optimum bei pH 5,6, der nur durch extrem hohe Substratkonzentrationen (4 bis  $>20 \text{ mM}$ ) gesättigt wird und von Monocarboxylaten und

Maleinat kompetitiv hemmbar ist. Für diesen Carrier wurde vorgeschlagen, daß es sich um ein Dicarboxylatcarrier handelt, der C<sub>4</sub>-Dicarboxylate als Monoanionen bei saurem pH transportiert. Der Carrier wurde bislang weder als Gen noch als Protein identifiziert.

Über Monocarboxylatcarrier in *E. coli* ist noch wenig bekannt. Nur für Lactat (LctP) und Formiat (FocA, FocB) sind die Carrier identifiziert und charakterisiert (Saier, 1999, Paulsen *et al.*, 1998). Zur LctP Familie gehört noch der potentielle Monocarboxylatcarrier YghK. Weitere Kandidaten für Carboxylattransporter gibt es in verschiedenen Familien, beispielsweise das *dctA* homologe Gen *ygjU* (DAACS-Familie), die *citT* homologen Gene *ygjE* und *ybhl* (DASS-Familie), sowie die *dctPQM* homologen Gene *yiaMNO* (TRAP-Familie).

In der Fünffachmutante ist auch der Succinatefflux in der Glucosefermentation nicht eingeschränkt. Die Effluxgeschwindigkeit beträgt ebenfalls ein Vielfaches (200 fach bei einer angenommenen intrazellulären Konzentration von 10 mM Succinat) der Diffusionsgeschwindigkeit. Deshalb kann die Diffusion auch keinen nennenswerten Beitrag zum Efflux leisten. Aus diesem Grund muß man annehmen, daß neben DcuC (Zientz *et al.*, 1999) ein weiterer Carrier zum Succinatefflux beiträgt, und daß es sich dabei nicht um DcuD handelt.

### **Das Fumaratregulationssystem DcuSR**

Die Proteine DcuSR aus *E. coli*, CitAB aus *E. coli*, *K. pneumoniae* (Bott *et al.*, 1995) und *Streptomyces coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996) und CitST, YufLM und DctSR aus *Bacillus subtilis* (Yamamoto *et al.*, 1999, Asai *et al.*, 2000) gehören zur Familie der CitAB Zweikomponentensysteme (Kaspar *et al.*, 1999). CitA aus *E. coli* ist der Citratsensor und CitB der Responseregulator. Beim anaeroben Wachstum mit Glycerin und Citrat reguliert CitAB die Expression des Citratclusters (Bott *et al.*, 1995).

DcuS besteht aus einem N-terminalen periplasmatischen und einem C-terminalen cytoplasmatischen Teil. Der cytoplasmatische Bereich besteht aus einer PAS-Domäne und der Kinase-Domäne. PAS-Domänen erkennen möglicherweise Signale aus dem Elektronentransport um sie an Regulationssysteme weiterzugeben (Taylor *et al.*, 1999). Die Funktion der PAS-Domäne von DcuS ist bislang nicht bekannt.

Die periplasmatische Bindedomäne befindet sich zwischen zwei Transmembranhelices mit denen DcuS in der Membran verankert ist. Die Struktur dieser Bindedomäne wurde mit NMR-Spektroskopie untersucht. Dabei konnte die Sekundärstruktur vollständig aufgeklärt werden (Abb. 21b). Die Bindedomäne besteht aus 4  $\beta$ -Faltblättern und 4  $\alpha$ -Helices in der Reihenfolge  $\alpha_2\beta_1\alpha_1\beta_3\alpha_1$ . Die dreidimensionale Struktur ist noch nicht vollständig aufgeklärt, ein vorläufiges Modell kann aber schon entworfen werden (Abb. 21b). Insbesondere die Lage von benachbarten Sekundärstrukturen zueinander ist recht gut abgesichert, kleine Änderungen in der Position von weiter entfernten Strukturen sind aber noch zu erwarten. Die  $\beta$ -Faltblätter liegen nahezu in einer Ebene und in antiparalleler Anordnung. Sowohl am C-terminalen als auch am N-terminalen Ende der periplasmatischen Domäne befindet sich eine  $\alpha$ -Helix, die jedoch keine direkte Verbindung zu den Transmembranhelices haben. Zwischen den Faltblättern  $\beta_1$  und  $\beta_2$  liegt eine weitere  $\alpha$ -Helix. Zwischen den Helices und Faltblättern befinden sich "U-turns", Schleifen und unstrukturierte Bereiche.

Die Struktur der periplasmatischen Domäne unterscheidet sich damit deutlich von der des Aspartatsensors (Tar) aus *E. coli* (Chi *et al.*, 1997, Yeh *et al.*, 1993, 1996). Der dimere Aspartatsensor gehört zur Familie der Methylchemotaxisproteine. Sie haben untereinander hohe Sequenzähnlichkeit und sind Sensoren für Lock- und Schreckstoffe, die zur Autophosphorylierung der Sensorkinase CheA führen. Daraufhin wird der Responseregulator CheY phosphoryliert, der direkt den Geißelmotor reguliert. Methylchemotaxisproteine unterscheiden sich von Zweikomponentensystemen und regulieren die Aktivität von Proteinen, nicht aber deren Synthese. Methylchemotaxisproteine werden nicht phosphoryliert, unterliegen aber einer Methylierung (Le Moual *et al.*, 1997). Sie gehören damit nicht zu der Sensorfamilie der Zweikomponentensysteme.

Der Aspartatsensor ist mit zwei Transmembranhelices in der Membran verankert. Dazwischen befindet sich eine große periplasmatische Domäne die aus 4  $\alpha$ -Helices besteht (Milburn *et al.*, 1991, Chi *et al.*, 1997, Bowie *et al.*, 1995). Zwei der Helices stellen eine direkte Verlängerung der beiden Transmembranhelices dar (Kim *et al.*, 1999, Ottemann, 1998, 1997). In der periplasmatischen Domäne von Tar befinden sich keine  $\beta$ -Faltblätter. An der Aspartatbindestelle sind nach Yeh *et al.* (1993) die Argininreste 69 und 73 des einen Monomers und Arginin 64, Glutamin 152 und Thyrosin 149 und 154 des anderen Monomers beteiligt. Aspartatbindung bewirkt kleine Strukturveränderungen der periplasmatischen Domäne und eine Verschiebung

der Transmembranhelices gegeneinander (Yeh *et al.*, 1993). Da die  $\alpha$ -Helices 1 und 4 die Transmembranhelices direkt verlängern, soll nach dem „Piston-Modell“ (Ottemann *et al.*, 1999, 1998, Lynch *et al.*, 1992) diese Verschiebung in linearer Weise geschehen. Daraus ergibt sich eine Kolbenartige Verschiebung der Transmembranhelices gegeneinander und eine Übertragung des Signals ins Cytoplasma. Die bisherigen Ergebnisse zur Struktur der periplasmatischen Domäne von DcuS unterscheiden sich deutlich vom Aspartatsensor, denn bei DcuS überwiegen die  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Da die Grundlage des „Piston-Modells“ auf dem Vorhandensein von  $\alpha$ -Helices und dem Fehlen von  $\beta$ -Faltblättern basiert ist zu vermuten, daß bei DcuS auch ein anderes Prinzip der Signalweiterleitung existiert. Wie die Sensor kinase DcuS das Fumarat erkennt, war bislang völlig unklar. Die Sensor kinasen der CitAB Familie zeigen hohe Ähnlichkeit in der Proteinsequenz (Kaspar *et al.*, 1999). Dies läßt auch eine ähnliche Funktionsweise vermuten. Ein Alignment der Aminosäuresequenz der periplasmatischen Domänen der Proteine DcuS und CitA aus *E. coli* und *K. pneumoniae* zeigt die große Ähnlichkeit der Proteine in diesem Bereich (Abb. 31). Der Argininrest 147 ist bei DcuS und den verwandten Sensor kinasen der CitA Familie konserviert. Ein weiterer Argininrest (R107) ist in CitA aus *E. coli* und *K. pneumoniae* als auch in DcuS aus *E. coli* konserviert.

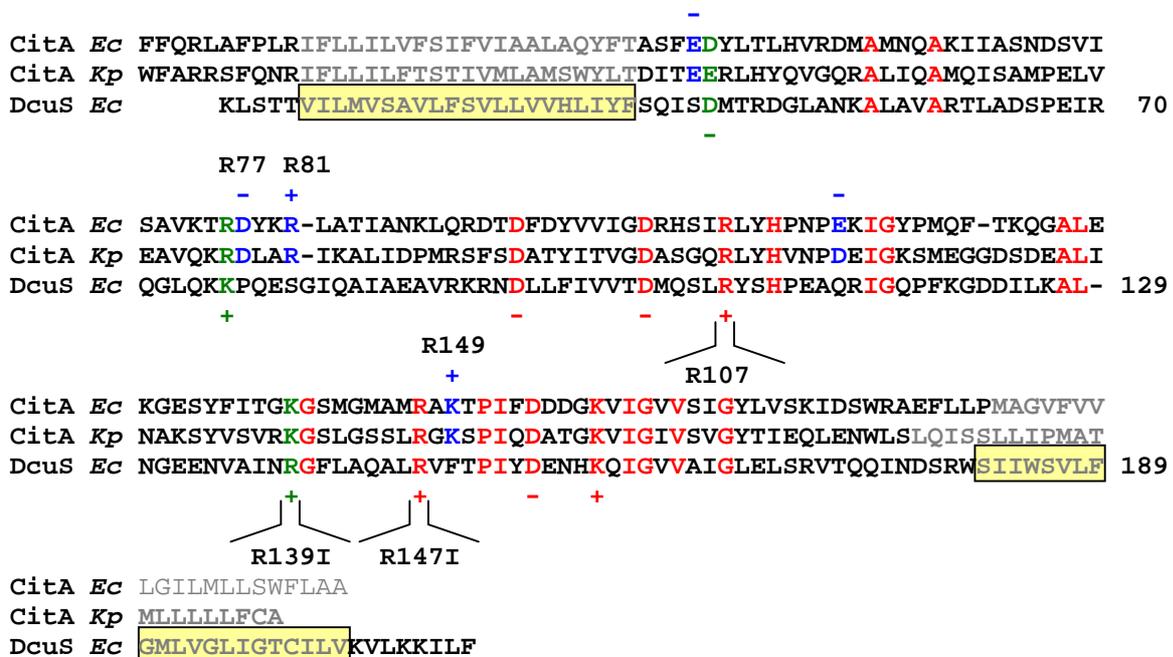


Abb. 31 Aminosäuresequenz der periplasmatischen Domäne von DcuS von *E. coli* (*Ec*) im Vergleich zu CitA von *E. coli* und *K. pneumoniae* (*Kp*). Identische und geladene Aminosäuren sind hervorgehoben. Die vermutlichen Positionen der Transmembranhelices sind gelb unterlegt. Argininreste die möglicherweise an der Substratbindung beteiligt sind und Argininreste die durch Mutagenese ausgetauscht wurden, sind ebenfalls angegeben.

Durch Mutagenese konnte die Beteiligung des Argininrestes 147 von DcuS an der Fumaratbindung gezeigt werden. Der nicht konservierte Argininrest 139 ist an der Bindung von Fumarat hingegen nicht beteiligt. Möglicherweise trägt auch der Argininrest 107 zur Ligandenbindung bei. Dies könnte sowohl für die Bindung von Fumarat an DcuS, als auch für die Bindung von Citrat an CitA (Gerharz *et al.*, 2001) gelten. So könnten die negativen Ladungen der beiden Carboxygruppen von Fumarat durch die zwei positiv geladenen Argininreste gebunden werden. An der Bindung von Citrat könnte noch ein weiterer positiv geladener Aminosäurerest beteiligt sein, der die dritte Carboxygruppe bindet. Hier sind die Argininreste 77 und 81 und der Lysinrest 149 mögliche Kandidaten. Sie sind nur bei den CitA Proteinen konserviert, nicht jedoch bei DcuS.

Die potentielle Fumaratbindestelle liegt im dritten  $\beta$ -Faltblatt (Arginin 147) und zwischen dem ersten  $\beta$ -Faltblatt und der dritten  $\alpha$ -Helix (Arginin 107). Möglicherweise liegen diese Argininreste in räumlicher Nähe und bilden eine positiv geladene Fumaratbindetasche. Mit vollständiger Aufklärung der dreidimensionalen Struktur ist in den nächsten Monaten zu rechnen und sollte diesen Punkt klären helfen.

### **Phosphorylierung von DcuS**

Das Membranprotein DcuS konnte isoliert und in Liposomen rekonstituiert werden. DcuS war aktiv und zeigte Autophosphorylierung und Phosphotransfer zu DcuR. Quantitative Auswertungen zeigten aber, daß nur ein kleiner Teil der Proteine phosphoryliert wurde. Dabei ist zu bemerken, daß nur eine Konzentration von 100 nM  $\gamma$ -[<sup>33</sup>P]-ATP im Versuchsansatz vorhanden war. Das ist eine sehr unphysiologische Konzentration. In der Zelle kommt ATP in einer Konzentration bis zu 10 mM vor (Tran *et al.*, 1998). Es ist daher wahrscheinlich, daß die eingesetzte ATP Konzentration nicht ausreichend für eine quantitative Phosphorylierung von DcuS war. Der lineare Anstieg der Phosphorylierung bis zu 30 Minuten deutet ebenfalls auf fehlende Substratsättigung hin. Bei den Sensorkinasen ArcB (Georgellis *et al.*, 1999) und EnvZ (Aiba *et al.*, 1989) aus *E. coli* wurde bereits nach 1 bzw. 5 min eine Sättigung der Autophosphorylierung beschrieben.

Andere Arbeitsgruppen haben die Phosphorylierung nur relativ bestimmt. Qualitativ wurde die Phosphorylierung bisher bei mehreren Zweikomponentensystemen nachgewiesen: CitAB von *Klebsiella pneumoniae* (Kaspar *et al.*, 1999), ArcAB von *E. coli*

(Georgellis *et al.*, 1999), KdpDE von *E. coli* (Jung *et al.*, 1997), RegSR von *Bradyrhizobium japonicum* (Emmerich *et al.*, 1999), SenX3-RegX3 von *Mycobacterium bovis* (Himpens *et al.*, 2000), FixL von *Rhizobium meliloti* (Gilles-Gonzalez *et al.*, 1991) und EnvZ-OmpR von *E. coli* (Aiba *et al.*, 1989). Angaben über den Anteil von phosphoryliertem Protein am Gesamtprotein wurden von diesen Autoren nicht gemacht.

Die Experimente zur Substratspezifität von DcuS ergaben eine deutliche Bevorzugung von Fumarat und Succinat. Andere Mono-, Di- und Tricarboxylate als Substrate führten hingegen zu keiner Steigerung der Autophosphorylierung von DcuS. Die Effektoren Tartrat, Formiat und Acetat führten sogar zu einer Verminderung der Phosphorylierung. Der Unterschied vom schlechtesten Effektor (Acetat) zum besten Effektor (Fumarat) beträgt aber nur Faktor 3 - 4. Möglicherweise ist hier wieder die geringe ATP Konzentration verantwortlich, so daß diese Experimente mit mehr ATP wiederholt werden sollten. In Arbeiten an dem Zweikomponentensystem DctBD aus *Rhizobium leguminosarum* wurde gezeigt, daß der Dicarboxylatcarrier DctA an der Signalerkennung beteiligt ist und die Substratspezifität der Sensorkinase erhöht (Reid *et al.*, 1998). Eine Beeinflussung von DcuS aus *E. coli* durch die Carrier DcuA, DcuB, DcuC, DcuD oder DctA kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Da allerdings bei der *in vitro* Bestimmung des  $K_D$ -Wertes für Dicarboxylate kein Carrier die Messung beeinflusst und der Wert (1 mM) vergleichbar ist mit dem *in vivo* bestimmten Wert (3 mM), ist eine Beteiligung der Carrier an der Signalerkennung von DcuS unwahrscheinlich. Obwohl DctB aus *Rhizobium leguminosarum* und DcuS aus *E. coli* Sensoren für  $C_4$ -Dicarboxylate sind, haben sie keine Ähnlichkeit in ihrer Proteinsequenz. Daher ist es denkbar, daß auch die Signalerkennung bei diesen Sensorkinasen unterschiedlich funktioniert.

## 6. Veröffentlichungen

Janausch, I.G. & Uden G. (1999)

The *dcuD* (former *yhcL*) gene produkt of *Escherichia coli* as a member of the DcuC family of C<sub>4</sub>-dicarboxylate carriers: lack of evident expression  
Arch. Microbiol. 172: 219 - 226

Zientz, E., Janausch, I.G. & Uden G. (1999)

Functioning of DcuC as the C<sub>4</sub>-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by *Escherichia coli*  
J. Bacteriol. 181 (12): 3716 - 20

Schnorpfeil, M., Janausch, I.G., Biel, S., Kröger, A. & Uden G. (2001)

Generation of a proton potential by succinate dehydrogenase of *Bacillus subtilis* functioning as fumarate reductase  
Eur. J. Biochem. 268 (10): 3069 - 74

Janausch, I.G., Kim, O. & Uden G. (2001)

DctA and Dcu independent transport of succinate in *Escherichia coli*: contribution of diffusion and of alternative carriers  
Arch. Microbiol. 175: in Druck

Janausch, I.G., Zientz, E., Kröger, A. & Uden, G. (2001)

Transport of C<sub>4</sub>-dicarboxylates and regulation by C<sub>4</sub>-dicarboxylates in bacteria  
Review, eingereicht

## 7. Literatur

- Aiba, H., Mizuno, T. & Mizushima, S. (1989)  
Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*  
J. Biol. Chem. 264 (15): 8563 - 8567
- Alting-Mees, M.A. & Short, J.M. (1989)  
pBlueskript II: Gene Mapping Vektors  
Nucl. Acids Res. 17: 9494
- Asai, K., Baik, S.H., Kasahara, Y., Moriya, S. & Ogasawara, N. (2000)  
Regulation of the transport system for C<sub>4</sub>-dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*  
Microbiology 146: 263 - 271
- Baker, K.E., Ditullio, K.P, Neuhard, J. & Kelln, R.A (1996)  
Utilization of orotate as a pyrimidine source by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* requires the dicarboxylate transport protein encoded by *dctA*  
J. Bacteriol. 178: 7099 - 7105
- Bender, R.A., (1996)  
Variations on a theme by *Escherichia*. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> edition, Neidhardt F (ed) Washington, DC, American Society for Microbiology Press, p. 4 -12
- Blattner, F.R., et al. (1997)  
The complete genome sequence of *Escherichia coli* K - 12  
Science 277: 1453 - 1463
- Bott, M., Meyer, M. & Dimroth, P. (1995)  
Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*  
Mol. Microbiol. 18(3): 533 - 546
- Bowie, J.U., Pakula, A.A. & Simon, M.I. (1995)  
The three-dimensional structure of the aspartate receptor from *Escherichia coli*  
Acta Crystallogr. 51: 145 - 154
- Chen, W. & Kuo, T. (1993)  
A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA  
Nucl. Acid Res. 21: 2260
- Chi, Y.I., Yokota, H. & Kim, S.H. (1997)  
Apo structure of the ligand-binding domain of aspartate receptor from *Escherichia coli* and ist comparisons with ligand-bound or pseudoligand-bound structures  
FEBS Letters 414: 327 - 332

- Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. (1989)  
One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2172 - 2175
- Conlin, C.A., Knox T.M. & Miller C.G. (1994)  
Cloning and physical map position of an  $\alpha$ -aspartyl dipeptidase gene, *aspE* from *Escherichia coli*  
J. Bacteriol. 176: 1552 - 1553
- Davies, S. J., Golby, P., Omrani, D., Broad, S.A., Harrington, V.L., Guest, J.R., Kelly, D.J. & Andrews, S.C. (1999)  
Inactivation and regulation of the anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*  
J. Bacteriol. 181(18): 5624 - 5635
- Eiglmeier, K., Honoré, N., Iuchi, S., Lin, E.C.C. & Cole, S.T. (1989)  
Molecular genetic analysis of FNR dependent promoters  
Mol. Microbiol. 3: 869 - 878
- Emmerich, R., Panglungtshang, K., Strehler, P., Hennecke, H. & Fischer, H.M. (1999)  
Phosphorylation, dephosphorylation and DNA-binding of the *Bradyrhizobium japonicum* RegSR two-component regulatory proteins  
Eur. J. Biochem. 263: 455 - 463
- Engel, P., Krämer, R. & Uden, G. (1992)  
Anaerobic fumarate transport in *Escherichia coli* by an *fnr*-dependent dicarboxylate uptake system which is different from the aerobic dicarboxylate uptake system  
J. Bacteriol. 174: 5533 - 5539
- Engel, P., Krämer, R. & Uden, G. (1994)  
Transport of C<sub>4</sub>-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*: Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux  
Eur. J. Biochem. 222: 605 - 614
- Fleischmann, R.D., et al. (1995)  
Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*  
Rd. Science 269: 496 - 512
- Forward, J.A., Behrendt, M.C. & Kelly, D.J. (1993)  
Evidence that the high affinity C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport system of *Rhodobacter capsulatus* is a novel type of periplasmic permease  
Biochem. Soc. Trans. 21: 343
- Forward, J.A., Behrendt, M.C., Wyborn, N.R., Cross, R. & Kelly, D.J. (1997)  
TRAP transporters: A new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse Gram-negative bacteria  
J. Bacteriol. 179: 5482 - 5493

- Gokarn, R.R., Eiteman, M.A. & Altman, E. (2000)  
Metabolic analysis of *Escherichia coli* in the presence and absence of the carboxylating enzymes Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Pyruvate Carboxylase  
Appl. Env. Microbiol. 66 (5): 1844 - 1850
- Gamas, P., Chandler, M.G., Prentki, P. & Galas, D.J. (1987)  
*Escherichia coli* integration host factor binds specifically to the ends of the insertion sequence IS1 and to its major insertion hot spot in pBR322  
J. Mol. Biol. 195: 261 - 2772
- Georgellis, D., Kwon, O. & Lin, E.C.C. (1999)  
Amplification of Signaling Activity of the Arc two-component system of *Escherichia coli* by the Anaerobic Metabolites  
J. Bacteriol. Chem. 274 (50): 35950 - 35954
- Gerharz, T., Kaspar, S. & Bott, M. (2001)  
Identification of amino acid residues which are essential for citrate binding by the periplasmic domain of the sensor kinase CitA from *Klebsiella pneumoniae*  
Biospektrum Sonderausgabe zur VAAM Jahrestagung 2001: Poster PSP53
- Gilles-Gonzalez, M.A., Ditta, G.S. & Helinski, D.R. (1991)  
A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*  
Nature 350: 170 - 172
- Golby, P., Kelly, D.J. Guest, J.R. & Andrews, S.C. (1998)  
Transcriptional regulation and organisation of the *dcuA* and *dcuB* genes, encoding homologous anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*  
J. Bacteriol. 180(24): 6586 - 6596
- Golby, P., Davies, S., Kelly, D.J., Guest, J.R. & Andrews, S.C. (1999)  
Identification and characterization of a two-component sensor kinase and response regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C<sub>4</sub>-dicarboxylates in *Escherichia coli*  
J. Bacteriol. 181: 1238 – 1248
- Gutowski, S.J., Rosenberg, H. (1975)  
Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K-12  
J. Biochem. 152: 647 - 654
- Hall, B.G., Yokoyama, S. & Calhoun, D.H. (1983)  
Role of cryptic genes in microbial evolution  
Mol. Biol. Evol. 1 (1): 109 - 124
- Hall, B.G. (1988)  
Widespread Distribution of Deletions of the *bgl* operon in Natural Isolates of *Escherichia coli*  
Mol. Biol. Evol. 5(4): 456 – 467

- Hamblin, M.J., Shaw, J.G. & Kelly, D.J. (1993)  
Sequence analysis and interposon mutagenesis of a sensor-kinase (DctS) and response-regulator (DctR) controlling synthesis of the high affinity C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport system in *Rhodobacter capsulatus*  
Mol. Gen. Genet 237: 215 - 224
- Hanahan, D. (1983)  
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids  
J. Mol. Biol. 166: 557 - 565
- Haydon, D.J. & Guest, J.R. (1991)  
A new family of bacterial regulatory proteins  
FEMS Microbiol. Lett. 79: 291 - 296
- Heidelberg, J.F., Venter, J.C. & Fraser C.M. (2000)  
DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*  
Nature 406: 477 - 483
- Himpens, S., Loch, C. & Supply, P. (2000)  
Molecular characterization of the mycobacterial SenX3-RegX3 two-component system: evidence for autoregulation  
Microbiol. 146: 3091 - 3098
- Hinton, J.C.D. (1997)  
The *Escherichia coli* genome sequence: the end of an era or the start of the FUN  
Mol. Mikrobiol. 26: 417 - 512
- Holloway, P.W. (1973)  
A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples  
Anal. Biochem. 53(1): 304 - 308
- Holmes, D.S. & Quigley, M. (1981)  
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids  
Anal. Biochem. 114: 193
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990)  
High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids  
Gene 96: 23 - 28
- Janausch, I.G. (1997)  
Rolle des Gens *yhcL* beim Transport von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten in *Escherichia coli*  
Diplomarbeit  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Janausch, I.G., Zientz, E., Kröger, A. & Unden, G. (2001)  
Transport of C<sub>4</sub>-dicarboxylates and regulation by C<sub>4</sub>-dicarboxylates in bacteria  
Review, in preparation

- Jaurin, B. & Normark, S. (1983)  
Insertion of IS2 Creates a Novel *ampC* Promoter in *Escherichia coli*  
Cell 32: 809 - 816
- Jung, K., Tjaden, B. & Altendorf, K. (1997)  
Purification, Reconstitution and Characterization of KdpD, the Turgor Sensor of *Escherichia coli*  
J. Bacteriol. 272: 10847 – 10852
- Kaim, G. & Dimroth, P. (1998)  
Voltage generated torque drives the motor of the ATP synthase  
EMBO J. 17: 5887 – 5895
- Kaim, G. & Dimroth, P. (1999)  
ATP-Synthesis by F-type ATP synthase is obligatory dependent on the transmembrane voltage  
EMBO J. 18: 4118 – 4127
- Kaspar, S., Perozzo, R., Reinelt, S., Meyer, M., Pfister, K., Scapozza, L. & Bott, M. (1999)  
The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor  
Mol. Microbiol. 33 (4): 858 - 872
- Kay, W. W. & Kornberg, H. L. (1971)  
The uptake of C<sub>4</sub>-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*  
Eur. J. Biochem. 18: 274 – 281
- Kelly, D.J. & Thomas G.H. (2001)  
The Tripartite ATP-independent Periplasmic (TRAP) transporters of Bacteria and Archaea  
FEMS Microbiol. Rev. 25: in press
- Kim, K.K., Yokota, H. & Kim, S.H. (1999)  
Four-helix-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor  
Nature 400: 787 – 792
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Uden, G. & Lancaster R.D. (2001)  
Fumarate respiration of *Wollinella succinogenes*: enzymology, energetics, and coupling mechanism  
Review, in preparation
- Le Moual, H., Quang, T. & Koshland, D.E. (1997)  
Methylation of the *Escherichia coli* chemotaxis receptors: intra- and interdimer mechanisms  
Biochemistry 36 (43): 13441 - 8
- Lucht, J. & Bremer, E., (1992)  
nicht veröffentlichte Daten

- Lütgens, M. & Gottschalk, G. (1980)  
Why a co-substrate is required for anaerobic growth of *Escherichia coli* on citrate  
J. Gen. Microbiol. 119: 63 - 70
- Lynch, B.A. & Koshland, D.E. Jr. (1992)  
The fifth Datta Lecture. Structural similarities between the aspartate receptor of bacterial chemotaxis and the *trp* repressor of *E. coli*. Implications for transmembrane signaling  
FEBS Lett. 307(1): 3 - 9
- Martinez, J., Steenbergen, S. & Vimr, E. (1995)  
Derived Structure of the Putative Sialic Acid Transporter from *Escherichia coli* Predicts a Novel Sugar Permease Domain  
J. Bacteriol. 177(20): 6005 - 6010
- May, B.J., Zhang, Q., Li, L.L., Paustian, M.L., Whittam, T.S. & Kapur, V. (2001)  
Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida* Pm70  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 3460 - 3465
- Milburn, M.V., Prive, G.G., Milligan, D.L., Scott, W.G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshland, D.E. Jr. & Kim, S.H. (1991)  
Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand  
Science 254: 1342 - 1347
- Miller, J.H. (1992)  
A short course in bacterial genetics  
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York  
Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L. & Smith, D.F. (1974)  
Culture medium for *Enterobacteria*  
J. Bacteriol. 119: 736 - 747
- Oden, K.L., De Veaux, L.C., Vibat, C.R., Cronan, J.E. & Gennis R.B. (1990)  
Genomic replacement in *Escherichia coli* K-12 using covalently closed circular plasmids DNA  
Gene 96: 29 - 36
- Ostrow, K.S., Silhavy, T. J. & Garrett, S. (1986)  
Cis-Acting sites required for osmoregulation of *ompF* expression in *Escherichia coli* K-12  
J. Bacteriol. 168(3): 1165 - 1171
- Ottemann, K.M. & Koshland, D.E. (1997)  
Converting a transmembrane receptor to a soluble receptor: Recognition domain to effector domain signaling after excision of the transmembrane domain  
Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 11201 - 11204

- Ottemann, K.M., Thorgeirsson, T.E., Kolodziej, A.F., Shin, Y.K. & Koshland, D.E. (1998)  
Direct measurement of small ligand-induced conformational changes in the aspartate chemoreceptor using EPR  
*Biochemistry* 37 (20): 7062 - 9
- Ottemann, K.M., Xiao, W., Shin, Y.K. & Koshland, D.E. (1999)  
A Piston Model for Transmembrane Signaling of the Aspartate Receptor  
*Science* 285: 1751 - 1745
- Parac, T.N., Coligaev, B., Zientz, E., Unden, G. & Griesinger, C. (2001)  
Assignment of <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance to the sensory domain of the membraneous two component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*  
*J. Biomol. NMR* 19(1): 91 – 92
- Parkinson, J.S. & Kofoed, E.C. (1992)  
Communication modules in bacterial signaling proteins  
*Annu. Rev. Genet.* 26: 71 - 112
- Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K. & Saier, M.H. Jr. (1998)  
Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities  
*J. Mol. Biol.* 277(3): 573 - 592
- Pfeifer, F., Sawers, G. & Wirth, R. (1993)  
EMBO: Course on advanced archaeal and bacterial genetics  
Manual, University Munich
- Plumbridge, J., & Vimr, E. (1999)  
Convergent Pathways for Utilization of the Amino Sugars *N*-Acetylglucosamine, *N*-Acetylmannosamine, and *N*-acetylneuraminic Acid by *Escherichia coli*  
*J. Bacteriol.* 181(1): 47 - 54
- Pos, K.M., Dimroth, P. & Bott, M. (1998)  
The *Escherichia coli* citrate carrier CitT: a member of a novel eubacterial transporter family related to the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts  
*J. Bacteriol.* 180: 4160 - 4165
- Rabus, R., Jack, D.L., Kelly, D.J. & Saier, M.H. (1999)  
TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters  
*Micobiol.* 145: 3431 - 3445
- Redenbach, M., *et al.* (1996)  
A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces Coelicolor* A3(2) chromosome  
*Mol. Microbiol.* 21: 77 - 96

- Reid, C.J. & Poole, P.S. (1998)  
Roles of DctA and DctB in Signal Detection by the Dicarboxylic Acid Transport System of *Rhizobium leguminosarum*  
J. Bacteriol. 180 (10): 2660 - 2669
- Rigaud, J.L., Pitard, B. & Levy, D. (1995)  
Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins  
Biochim. Biophys. Acta 1231: 223 – 246
- Saier, M.H., Jr. (1998)  
Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya  
Advances Microbiol. Physiol. 40: 81 - 136
- Saier, M.H., Jr. (1999)  
<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport/titlepage.html>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)  
Molecular cloning: A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed.  
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York  
Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schnetz, K. & Rak, B. (1992)  
IS5: A mobile enhancer of transcription in *Escherichia coli*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1244 - 1248
- Schnetz K. (1995)  
Silencing of *Escherichia coli* *bgl* promoter by flanking sequence elements  
EMBO J. 14 (11): 2545 - 50
- Schnetz, K. & Wang, J.C. (1996)  
Silencing of the *Escherichia coli* *bgl* Promoter: effects of template supercoiling and cell extracts on promoter activity in vitro  
Nucl. Acids res. 24 (12): 2422 - 2428
- Sharp, P.M. & Li, W.H. (1987)  
The codon adaptation index – a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications  
Nucl. Acids Res. 15: 1281 - 1295
- Silhavy, T.J., Berman, M. & Enquist, L.W. (1984)  
Experiments with gene fusions  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Six, S., Andrews, S.C., Uden, G. & Guest, J.R. (1994)  
*Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct)  
J. Bacteriol. 176: 6470 - 6478

- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986)  
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes  
J. Mol. Biol. 189: 113 - 130
- Taylor, B.L. & Zhulin, I.B. (1999)  
PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential and Light  
Microbiology and Molecular Biology Reviews 63(2): 479 - 506
- Terada, H. (1981)  
The interaction of highly active uncouplers with mitochondria  
Biochim. Biophys. Acta 639: 225 - 242
- Terpe, K., Kerkhoff, K., Pluta, E. & Jendrossek, D. (1999)  
Relationship between succinate transport and production of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Pseudomonas lemoignei*  
Appl. Env. Microbiol. 65 (4): 1703 - 9
- Tran, Q.T. & Uden, G. (1998)  
Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation  
Eur. J. Biochem. 251: 538 - 543
- Tseng, C.P. (1997)  
Regulation of fumarase (*fumB*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, iron and heme availability: role of the *arcA*, *fur* and *hemeA* gene products  
FEMS Microbiology Letters 157: 67 - 72
- Vimr, E.R. & Troy, F.A. (1985)  
Identification of an inducible catabolic system for sialic acids (*nan*) in *Escherichia coli* K12  
J. Bacteriol. 164: 845 - 853
- Wallace, B.J. & Young, I.G. (1977)  
Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*  
Biochim. Biophys. Acta 233: 109 - 122
- Winans, S.C., Elledge, S.J., Heilig Krüger, J. & Walker, G.C. (1985)  
Site-directed insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *Escherichia coli*  
J. Bacteriol. 161: 1219 - 1221
- Wishart, D.S., Sykes, B.D. & Richards, F.M. (1991)  
Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure  
J. Mol. Biol. 222(2): 311 - 333

- Wishart, D.S., Sykes, B.D. & Richards, F.M. (1992)  
The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy  
*Biochemistry* 31(6): 1647 - 1651
- Yamamoto, H., Murata, M. & Sekiguchi, J. (1999)  
CitST two component system regulates gene expression of citrate transport in *Bacillus subtilis*  
Abstracts of the 10th International Conference on Bacilli, Baveno, Italy, p. 71
- Yanisch-Perron, C.J., Vierara, J. & Messing, J. (1985)  
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors  
*Gene* 33: 103 - 119
- Yeh, J.I., Biemann, H.P., Pandit, J., Koshland, D.E. & Kim, S.H. (1993)  
The three dimensional Structure of the Ligand-binding Domain of a wildtype Bacterial Chemotaxis Receptor  
*JBC* 268(13): 9787 - 9792
- Yeh, J.I., Biemann, H.P., Privé, G.G., Pandit, J., Koshland, D.E. & Kim, S.H. (1996)  
High-resolution Structures of the Ligand Binding Domain of the wildtype Bacterial Aspartate Receptor  
*J. Mol. Biol.* 262: 186 - 201
- Zientz, E., Six, S. & Uden, G. (1996)  
Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*. Roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange  
*J. Bacteriol.* 178: 7241 - 7247
- Zientz, E., Bongaerts, J. & Uden, G. (1998)  
Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR*) two-component regulatory system  
*J. Bacteriol.* 180: 5421 - 5425
- Zientz, E., Janausch, I.G., Six, S. & Uden, G. (1999)  
Function of DcuC as the general C<sub>4</sub>-dicarboxylate carrier in anaerobically grown *Escherichia coli*  
*J. Bacteriol.* 181: 3716 - 3720
- Zientz, E. (2000)  
Identifizierung und Charakterisierung des Fumaratregulationssystems DcuSR aus *Escherichia coli*  
Doktorarbeit  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

